Brest 1975

Série C
N° d'ordre : 23
N° de série: 2
N° d'enregistrement au C.N.R.S.
A.O. 7522

THÈSE

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
SCIENCES EXACTES ET NATURELLES
POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

MADELEINE PÉRESSE

RELATIONS HÔTE-PARASITE DANS LES TRACHÉOMYCOSES.
QUELQUES UNS DE LEURS ASPECTS
DANS LE MODÈLE ŒILLET - *PHIALOPHORA CINERESCENS* (WR) VAN BEYMA.

Soutenue le 3 mars 1975 devant la commission d'examen

Président : Mme M. MOREAU, Professeur à l'Université de Bretagne Occidentale,

Examinateurs : M. H. KERN, Professeur, Eidgenossische Technische Hochschule, Zürich,
Melle A.-M. CATESSON, Professeur à l'Université de Paris VI,
M. J. DUBOUCHET, Maître de Conférences à l'Université de Besançon.
M. J. PELHATE, Maître de Conférences à l'Université de Bretagne Occidentale.

Série C
N° d'ordre : 23
N° de série: 2
N° d'enregistrement au C.N.R.S.
A.O. 7522

THÈSE

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
SCIENCES EXACTES ET NATURELLES
POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

MADELEINE PÉRESSE

RELATIONS HÔTE-PARASITE DANS LES TRACHÉOMYCOSES.
QUELQUES UNS DE LEURS ASPECTS
DANS LE MODÈLE ŒILLET - *PHIALOPHORA CINERESCENS* (WR) VAN BEYMA.

Soutenue le 3 mars 1975 devant la commission d'examen

Président : Mme M. MOREAU, Professeur à l'Université de Bretagne Occidentale,

Examinateurs : M. H. KERN, Professeur, Eidgenossische Technische Hochschule, Zürich,
Melle A.-M. CATESSON, Professeur à l'Université de Paris VI,
M. J. DUBOUCHET, Maître de Conférences à l'Université de Besançon.
M. J. PELHATE, Maître de Conférences à l'Université de Bretagne Occidentale.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE

PRESIDENT : M. QUERRE Julien

DIRECTEURS DE THESE EN SCIENCES POUR L'ANNEE 1974-1975

Professeurs :	M. BOCLE Jean	(Mathématiques)
	M. JOHANNIN Pierre	(Physique)
	M. BELLON Louis	(Chimie)
	M. QUERRE Julien	(Mathématiques)
	Mme MOREAU Mireille	(Biologie)
	M. DIDIER Jean	(Géologie)
	M. PERESSE Joseph	(Physique)
	M. SAUMAGNE Pierre	(Chimie)
	Mme COURTOT Jacqueline	(Chimie)
	M. COURTOT Pierre	(Chimie et Océanographie)
	M. LE FLOCH Jean	(Océanographie)
	M. GUERCHAIS Jacques	(Chimie)
Professeurs sans chaire :	Mme JOHANNIN Andrée	(Physique)
	Mme LAHAYE Jacqueline	(Biologie)
	M. SERPOLAY Roger	(Physique)
	M. BARIN Claude	(Géologie)
	M. CHEZE Claude	(Physique)
	M. GENIN Robert	(Physique)
	M. PEYRAUD Claude	(Biologie)
	M. STURTZ Georges	(Chimie)
	M. BERTHE Guy	(Mathématiques)
	Mme GENIN Janine	(Physique)
	M. PENOT Michel	(Biologie)
	M. WOLFF Claude	(Physique)
	M. PICARD Elie	(Physique)
Maîtres de Conférences :	M. QUIVY Denis	(Physique)
	M. LUCAS Albert	(Biologie)
	M. RENOUX André	(Physique)
	M. BROISE Michel	(Mathématiques)
	M. PELHATE Joseph	(Biologie)
	M. LAURANSAN Jacques	(Chimie)
	M. CRAVELLE Michel	(Géologie)
	M. BOUVIER Pierre	(Physique)
	M. COUDEVILLE Henri	(Physique)
	M. SAVARY Gérard	(Physique)
	M. GUGLIELMETTI Robert	(Chimie)
	M. BOLLEY Pierre	(Mathématiques)
	M. CARVALLO Michel	(Mathématiques)
	M. CLERET Jean-Jacques	(Biologie)
	M. GLEMAREC Michel,	(Océanographie)
	M. TOURNEMINE Georges	(Mathématiques)
	M. BOURGEOIS Claude	(Biologie)
Maîtres de Recherche au CNRS	M. MOREAU Claude	(Biologie)
	M. CHAURIS Louis	(Géologie)

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545814_0027

S O M M A I R E

INTRODUCTION 1

I. L'oeillet. 2

II. Le parasite 6

III. Orientation générale du présent travail 14

CHAPITRE I : MATERIEL ET TECHNIQUES 17

I. L'oeillet et sa culture 17

II. Le parasite et l'obtention de l'inoculum 27

III. Modes d'infection 28

IV. Recherche du *Phialophora cinerescens* dans l'oeillet et dans le substrat 31

V. Techniques cytologiques 33

CHAPITRE II : EXPRESSION DES SYMPTOMES EN INFECTION EXPERIMENTALE. 39

I. Symptômes selon le mode d'infection au niveau des racines. . . . 39

II. Facteurs modifiant l'évolution des symptômes 51

III. Conclusion 70

CHAPITRE III : INSTALLATION DU *PHIALOPHORA CINERESCENS* DANS L'OEILLET. . . 72

I. Accès du *P. cinerescens* aux vaisseaux de l'oeillet 72

II. Progression du *P. cinerescens* dans l'oeillet 91

III. Discussion et conclusion 99

CHAPITRE IV : SPECIFICITE PARASITAIRE DU *PHIALOPHORA CINERESCENS* ET SENSIBILITE SPECIFIQUE DE L'OEILLET. 106

I. Parasitisme spécifique du *Phialophora cinerescens*. 106

II. Sensibilité spécifique de l'oeillet. 114

III. Comportement de l'oeillet vis-à-vis d'un agent de trachéomycoses très polyphage, le *Verticillium dahliae* Kleb. 122

CHAPITRE V : QUELQUES ASPECTS DES RELATIONS HOTE-PARASITE ET DES MECANISMES DE RESISTANCE CHEZ L'OEILLET 129

I. Examen microscopique des tissus malades : comportement du *P. cinerescens* dans les vaisseaux et réactions pathologiques dans le xylème 129

II. Contribution de l'analyse chimique 145

III. Contribution de la microscopie électronique 147

IV. Contribution de travaux de physiologie concernant la croissance 156

V. Tentative d'approche des mécanismes de résistance chez l'oeillet 159

VI. Conclusions 167

CONCLUSIONS GENERALES 170

RESUME 177

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 184

INTRODUCTION

S O M M A I R E

I. L'OEILLET

A) POSITION SYSTEMATIQUE

B) OBTENTION DES CULTIVARS ACTUELS DE L'OEILLET DES FLEURISTES

C) MORPHOLOGIE ET ANATOMIE

II. LE PARASITE

A) MORPHOLOGIE, CYTOLOGIE ET POSITION SYSTEMATIQUE

B) FACTEURS POUVANT INFLUENCER LE COMPORTEMENT DU *PHIALOPHORA CINERESCENS* EN CULTURE

1 - Facteurs génétiques

2 - Facteurs physiques

3 - Facteurs trophiques

4 - Confrontation avec d'autres champignons

III. ORIENTATION GENERALE DU PRESENT TRAVAIL

Parmi les nombreuses maladies qui affectent les plantes, les maladies vasculaires constituent un groupe bien particulier. Elles sont causées par des bactéries ou des champignons qui restent localisés dans le xylème de leur hôte pendant la plus grande partie de la pathogenèse. Il en résulte un syndrome caractéristique de ce type d'affection et un dépérissement plus ou moins rapide du végétal parasité.

Un grand nombre de plantes possédant des vaisseaux (Angiospermes) sont susceptibles d'en être atteintes; les Gymnospermes ne possédant que des trachéides n'en sont pas affectées (DIMOND, 1970). Beaucoup de végétaux cultivés y sont sensibles; l'incidence économique de ces maladies est considérable et elles ont fait l'objet de nombreux travaux. Parmi les trachéomycoses, les plus étudiées sont les fusarioses dues au *Fusarium oxysporum* (Schl.) Snyder et Hansen et les verticillioses dues au *Verticillium albo-atrum* Reinke et Berth. et au *Verticillium dahliae* Kleb. car elles touchent un grand nombre de cultures dans le monde entier; la maladie hollandaise de l'orme due au *Ceratocystis ulmi* (Buism.) C. Moreau qui menace gravement l'avenir de cet arbre, a aussi suscité d'importants travaux. Mais la lutte contre ce type de parasite reste difficile et l'usage de fongicides endothérapiques dont on a espéré beaucoup, ne semble pas avoir résolu tous les problèmes.

Le présent travail concerne une maladie de ce type : la verticilliose de l'oeillet. Elle est due au *Phialophora cinerescens* (Wr.) van Beyma et cause d'importantes pertes dans les plantations des dianthiculteurs. L'agent pathogène fut décrit dès 1930 par WOLLENWEBER sous le nom de *Verticillium cinerescens* et la maladie fut alors nommée "verticilliose". VAN BEYMA (1939) l'ayant par la suite rapporté au genre *Phialophora*, on devrait peut-être qualifier de "phialophorose" l'affection correspondante. Si les auteurs de langue anglaise parlent de " *Phialophora* wilt of carnation " et les auteurs italiens de "Fialoforosi del garofano", le terme de phialophorose ne semble pas avoir été adopté en France où a été conservée la dénomination antérieure de verticilliose que nous utiliserons donc dans

ce travail. Cette verticilliose de l'oeillet due au *Phialophora cinerescens* présente d'ailleurs des symptômes tout à fait analogues à ceux que provoquent les *Verticillium albo-atrum* et *dahliae* chez d'autres plantes comme la tomate, le concombre ou le chrysanthème.

Tout en constituant une maladie vasculaire typique, à évolution classique, cette trachéomycose de l'oeillet nous semble réaliser un modèle intéressant car les relations hôte-parasite s'établissent entre deux organismes qui présentent des caractères originaux certains. C'est pourquoi nous commencerons par présenter les deux protagonistes.

I. L'OEILLET

A) POSITION SYSTEMATIQUE

L'oeillet appartient à la famille des Caryophyllacées dans l'ordre des Centrospermales que certains systématiciens rattachent, avec d'autres ordres du même phylum, à un type "Urticale" très ancien car ils présentent des caractères nettement archaïques. Compte-tenu de l'embryogénèse, les Caryophyllacées pourraient être considérées comme le terme ultime d'une série qui aurait évolué séparément à partir d'ancêtres communs aux différentes familles des Centrospermales (CRETE, 1959; EMBERGER, 1960).

EMBERGER (1960) subdivise les Caryophyllacées en trois sous-familles qui, outre leurs caractères morphologiques, se distinguent par des caractères cytologiques et biochimiques : Paronychioïdées, Alsinoïdées, Silénoïdées.

La sous-famille des Silénoïdées comprend elle-même deux tribus : les Lychnidées et les Dianthées. Parmi ces dernières, le genre *Dianthus* peut être pris comme type.

Les Caryophyllacées possèdent des caractères originaux par bien des aspects.

- sur le plan anatomique : fréquence des formations tertiaires, de la disposition du xylème et du phloème primaires en cercles concentriques

dans la tige; vaisseaux à perforations simples, pas de rayons médullaires (METCALFE et CHALK, 1957).

- sur le plan cytologique : polyploïdie fréquente, notamment chez les Silénoïdées-Dianthées où les noyaux sont le plus souvent du type semi-réticulé alors que le type réticulé prédomine chez les Silénoïdées-Lychnidées (FAVARGER, 1946).

- sur le plan de l'embryogénèse : embryon courbe provenant entièrement de la cellule apicale du proembryon bicellulaire; périsperme (EMBERGER, 1960).

- sur le plan biochimique : oxalate de calcium abondant en grosses macles, alcaloïdes dans quelques genres, mais surtout importance des saponines (SWAIN, 1963) et présence de galactosides du saccharose (de la série du lychnose et de l'isolychnose); ces derniers ont été mis en évidence par COURTOIS et ses collaborateurs (ARCHAMBAULT, COURTOIS, WICKSTRÖM et LE DIZET, 1956), les Silénoïdées étant seules capables de synthétiser ces glucides très rares dans le monde vivant (COURTOIS et PERCHERON, 1965).

B) OBTENTION DES CULTIVARS* ACTUELS DE L'OEILLET DES FLEURISTES

Le genre *Dianthus* comprend actuellement entre 250 et 300 espèces dont l'aire de répartition s'étend principalement dans l'hémisphère Nord, surtout dans la région méditerranéenne. Le *Dianthus caryophyllus* L., apprécié pour la couleur, la taille, le parfum de ses fleurs, l'abondance de sa floraison et sa culture relativement facile est cultivé en Europe depuis plusieurs siècles. MOREAU (1957) retrace l'historique de sa culture qui connut un essor remarquable aux 17e et 18e siècles, en France notamment, et fut introduite en Amérique en 1852 (WARD, 1903).

---

*Dans les pages suivantes, nous emploierons indifféremment les termes "variété" (var.) ou "cultivar" (cv.), tous deux couramment utilisés, bien que "cultivar" qualifie plus précisément les obtentions horticoles.

Sous sa forme actuelle, "l'oeillet des fleuristes" présente des caractères très modifiés par rapport à l'espèce botanique. Les nombreux cultivars existants sont le produit d'une patiente sélection à la suite d'hybridations, de polyploïdisations, de mutations naturelles ou provoquées.

Les hybridations interspécifiques sont favorisées par le fait qu'une trentaine d'espèces de *Dianthus* ont un nombre diploïde de chromosomes égal à 30 comme le *D. caryophyllus* (FAVARGER, 1946). Cela constitue un réservoir de gênes pour l'hybrideur à moins qu'il ne se contente d'exploiter les possibilités multiples qu'offre l'hétérozygotie poussée des variétés déjà obtenues. D'après VINOT et BOUSCARY (1952), c'est dans un croisement entre le *D. caryophyllus* L. et le *D. lignosus* hort., réalisé par DALMAIS en 1835 à Lyon, que trouvent leur origine les variétés remontantes désignées globalement sous le nom d'"oeillets de Nice". Les croisements conduits par les dianthiculteurs américains ont fait naître un groupe de variétés désignées comme "oeillets américains" dont les fleurs de tenue parfaite (calice non crevard, rigidité de la tige), de couleurs pures, sont toutefois un peu moins grandes que celles de l'oeillet de Nice et sont loin de posséder leurs teintes riches et délicates. Parmi elles, la variété "William Sim", obtenue en 1938, a fourni plus de 200 sports de coloris variés qui sont vendus dans le monde entier (HOLLEY et BAKER, 1963).

Les efforts pour l'obtention de variétés nouvelles se poursuivent sans relâche afin d'améliorer des caractères tels que la bonne conservation en vase de la fleur coupée ou la résistance aux parasites, tout en suivant l'évolution du goût de la clientèle. A côté des procédés classiques, l'irradiation des boutures dont l'intérêt fut signalé par SAGAWA et MEHLQUIST en 1956, a été utilisée. Les radiations ionisantes (rayons X, rayons γ, neutrons rapides) ont une action mutagène et sont capables de provoquer l'apparition de chimères dont les caractères sont maintenus par la multiplication végétative (PEREAU-LEROY, 1965).

L'expérimentateur a donc à sa disposition de multiples cultivars aux potentialités génétiques variées dont il pourra explorer et exploiter les divers types de réaction en face d'une agression parasitaire. Inversement, la multiplication végétative par bouturage lui assure l'obtention de clones génétiquement homogènes, ce qui est un précieux atout dans la conduite et l'interprétation des essais expérimentaux.

C) MORPHOLOGIE ET ANATOMIE DE L'OEILLET

Il nous semble utile de les rappeler brièvement ici car bien des étapes du processus pathologique (pénétration, localisation et progression du parasite, réactions et expression des symptômes chez l'hôte) sont liées à la disposition des tissus.

1 - Tiges feuillées

Les tiges dressées portent des feuilles opposées décussées à bases concrescentes; elles sont enroulées sur elles-mêmes dans les variétés de type américain. Selon 4 génératrices de la tige, les feuilles sont donc exactement superposées, ce qui rend plus aisée l'observation des symptômes foliaires et de leur progression.

A la suite du pincement que pratiquent toujours les horticulteurs pour obtenir davantage de tiges florales, la plante se ramifie, manifestant une anisocladie hélicoïdale : seuls les bourgeons situés à l'aisselle des feuilles de l'une des deux hélices foliaires se développent (LOISEAU, 1965).

La figure I (photographies A et B) nous rappelle, sur coupes transversales, la structure anatomique de la tige d'oeillet. Notons que les traces foliaires forment déjà à peu de distance du sommet du point végétatif, un manchon cylindrique complet de phloème et de xylème primaires; cette continuité du tissu conducteur favorise le passage du parasite de vaisseau à vaisseau et il est plus facile d'y suivre sa progression avec la gommose qui l'accompagne, aussi bien sur coupes longitudinales que transversales.

Le xylème est un tissu hétérogène qui comprend des cellules vivantes (parenchyme) et des éléments dépourvus de cytoplasme (vaisseaux); leur paroi, plus ou moins épaisse, reste cellulosique ou s'imprègne de lignine à des degrés divers. Selon les variétés, MOREAU (1957) distingue quatre types de répartition des tissus lignifiés chez l'oeillet. Or, de l'abondance et de la répartition des différents types cellulaires du xylème peut dépendre, dans une large mesure, l'évolution du processus pathologique; selon leur nature, ils opposent au parasite la résistance mécanique de leurs parois lignifiées ou mettent en jeu les diverses potentialités de réaction du cytoplasme vivant.

L'oeillet est, en outre, une plante pérenne qui, dans les cultures, est en général maintenue en place deux années successives et prend l'aspect d'un petit arbuste. Il sera donc possible d'y observer le développement du parasite dans le tissu ligneux de pousses jeunes encore herbacées et dans le xylème épais de tiges âgées, constitué par les cernes annuels de la croissance en épaisseur.

2 - Racines

L'oeillet a un système racinaire bien développé comportant de grosses racines et de nombreuses radicelles. La figure 2 (photographies A et B) montre, sur coupes transversales, leurs structures primaire et secondaire. Notons que les racines jeunes possèdent un endoderme très net, à cadres subérifiés et des faisceaux de phloème et de xylème distincts. Ceux-ci sont rapidement écrasés par le développement des tissus secondaires. Le xylème secondaire comporte un parenchyme ligneux abondant peu lignifié. La surface des racines âgées est protégée par un suber bien développé.

II. LE PARASITE

A) MORPHOLOGIE, CYTOLOGIE ET POSITION SYSTEMATIQUE

Ce champignon dont seule la forme imparfaite est connue, fut pour la première fois signalé en Rhénanie comme agent de dépérissement des oeillets par WOLLENWEBER (1930) qui, rappelons le, le décrivit sous le nom de *Verticillium cinerescens*. Sa présence fut bientôt rapportée en Angleterre, en Italie (MAMELI CALVINO, 1938), aux Pays-Bas (ROODENBURG, 1945), aux Etats-Unis (GUBA, 1947) et en France (MOREAU, 1951, communication personnelle).

En 1939, VAN BEYMA rattache cette Hyphale au genre *Phialophora*, position confirmée ensuite par d'autres auteurs (LEWIS, 1959; MOREAU C., 1963; SCHOL-SCHWARZ, 1970).

Le mycélium, à croissance lente, est constitué d'hyphes d'aspect variable : les unes grêles et hyalines (1 à 2 µ de diamètre), d'au-

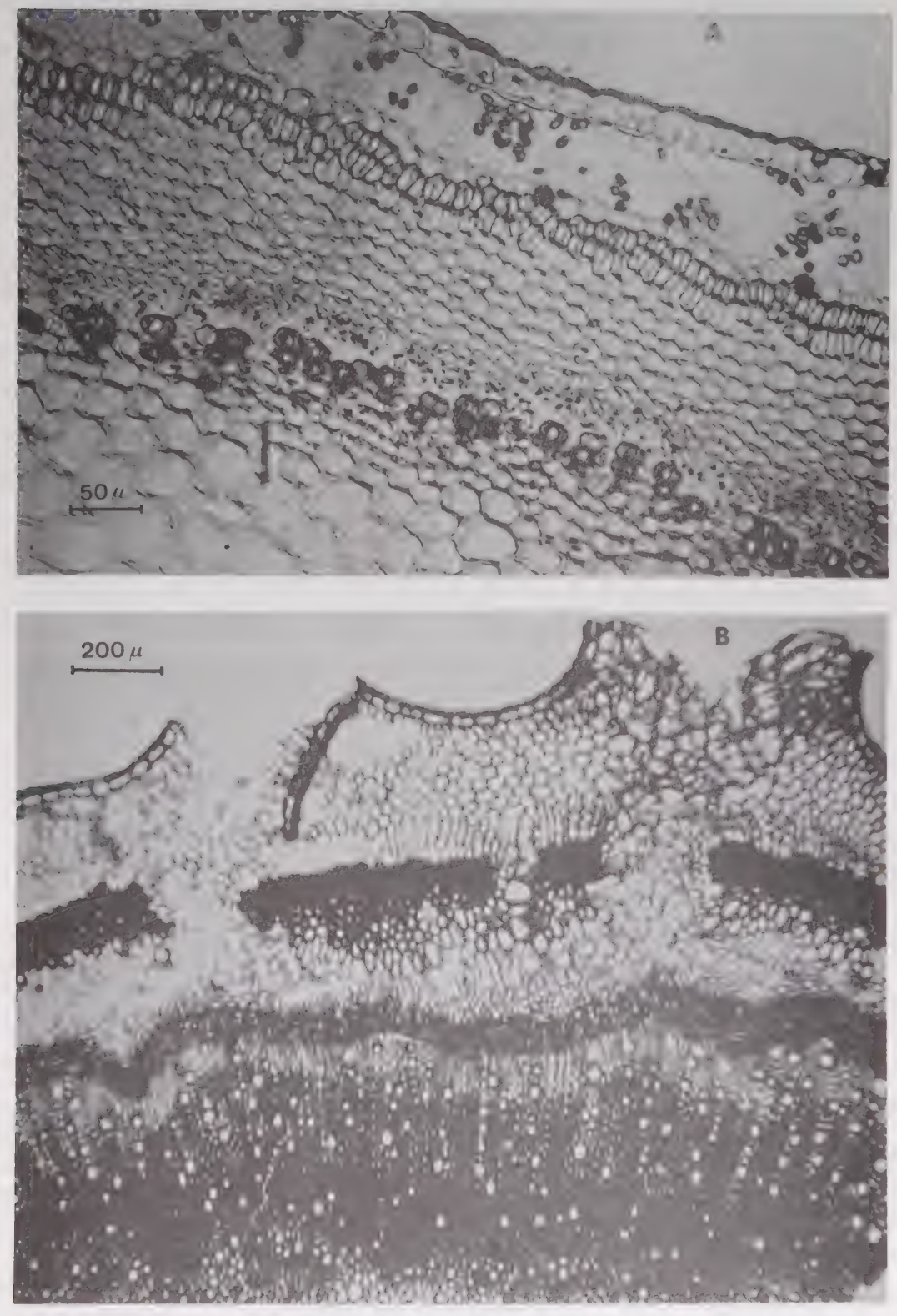


Fig. 1 : Coupe transversale d'une tige d'oeillet

A - structure primaire

B - structure secondaire

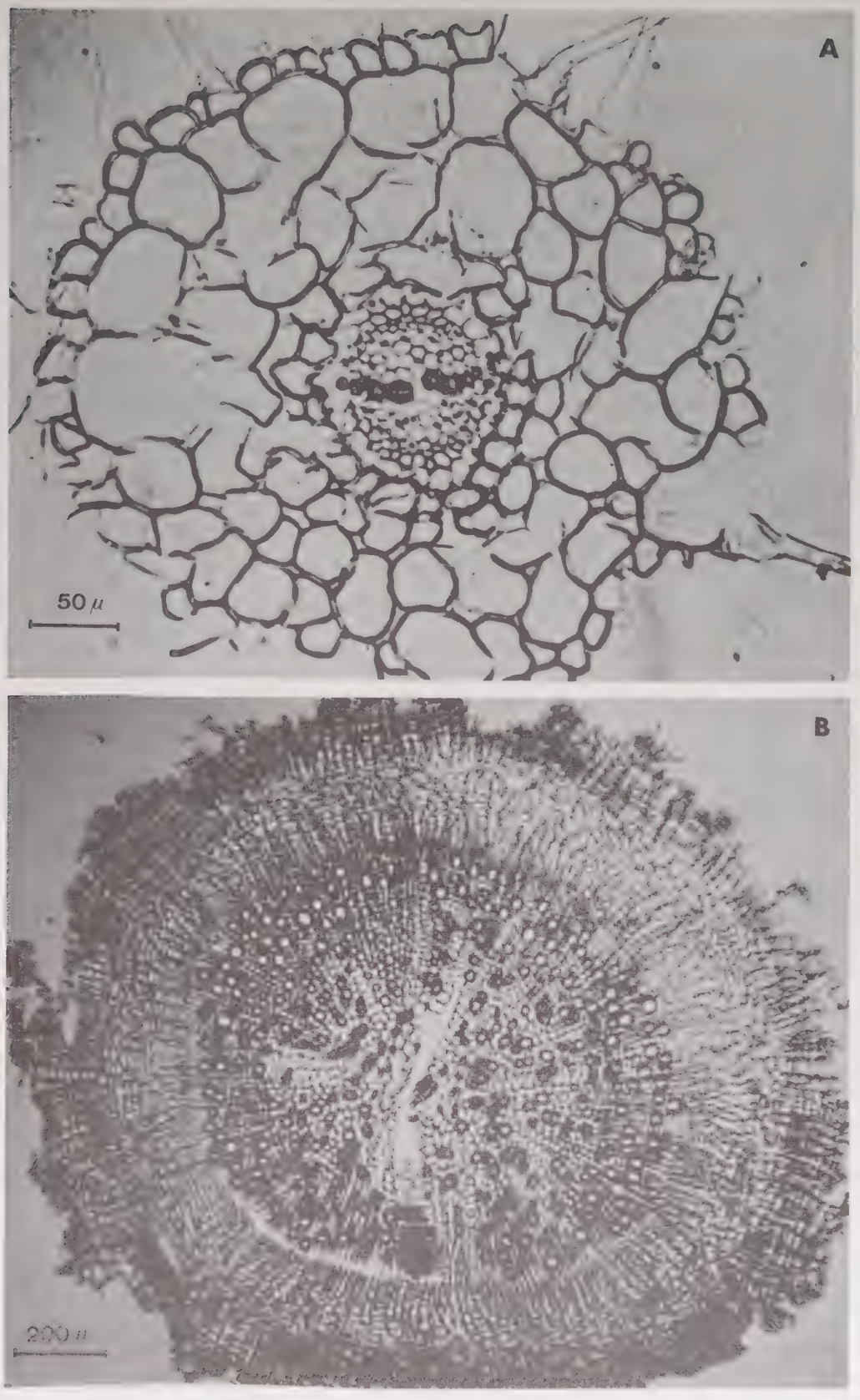


Fig. 2 : Coupe transversale d'une racine d'oeillet

A - structure primaire

B - structure secondaire

tres plus grosses (4 à 6 µ de diamètre), à paroi fuligineuse. Ces filaments mycéliens cloisonnés et ramifiés peuvent s'agréger en cordonnets. Les cloisons y sont perforées par un pore de 0,1 µ de diamètre (LE PICARD, 1972) et les articles en sont normalement uninucléés (TIRILLY, 1970; TIRILLY et LE PICARD, 1973).

Les phialides isolées ou plus souvent groupées en pinceaux ou en bouquets parfois volumineux (fig. 3), sont lagéniformes et munies d'une collerette. Elles donnent naissance à un grand nombre de spores unicellulaires, allongées (4 à 8 µ de long et 1,5 à 3 µ de large), noires en masse. Ce sont des myxospores, facilement disséminées dans le sol par la circulation des eaux de pluie ou d'arrosage (LAST et EBBEN, 1963). Phialides et spores sont uninucléées; toutefois des spores binucléées, deux fois plus grandes que les normales, ont pu être observées mais elles sont très rares (LE PICARD, 1972; TIRILLY et LE PICARD, 1973).

Aucune forme parfaite n'a été rapportée pour ce champignon. Certains de ses caractères peuvent cependant guider dans la recherche de sa position systématique éventuelle :

- Les articles successifs d'une hyphe communiquent par un pore dont la structure est celle décrite chez les Ascomycètes (LE PICARD, 1972).

- Les articles mycéliens sont uninucléés; or BERTHET (1961) montre que c'est aussi le cas chez la plupart des Discomycètes Inoperculés alors que, chez les Operculés, les articles sont toujours coenocytiques.

- En outre, de nombreux Inoperculés forment des conidies issues de phialides (BERTHET, 1964), ce qui n'est pas le cas des Operculés; les formes imparfaites des Mollisioïdées, en particulier, se rattachent au genre *Phialophora* (LE GAL et MANGENOT, 1956).

Tous ces arguments font penser que, si elle existe, la forme parfaite du *Phialophora cinerescens* serait peut-être à rechercher parmi ces Ascomycètes Inoperculés.

B) FACTEURS POUVANT INFLUENCER LE COMPORTEMENT DU *PHIALOPHORA CINERESCENS* EN CULTURE

1 - Facteurs génétiques

Des souches d'origines diverses peuvent présenter de nettes différences dans leur aspect cultural, leur croissance, leur sporulation, leur pouvoir pathogène; mais une même souche, conservée très longtemps en culture par repiquages successifs, montre généralement une grande stabilité de ces caractères : entre autres, nous avons nous-mêmes vérifié que des isolats, entretenus en mycothèque depuis près de 20 ans, conservaient leur virulence (MOREAU, PERESSE et EL MAHJOUB, 1971). L'état uninucléé habituel des articles mycéliens et des spores est un facteur favorable à ce maintien.

Toute possibilité de variation n'est cependant pas exclue comme en témoigne la formation de secteurs à croissance rapide, dans les cultures maintenues à 22° C notamment (LE PICARD, 1972; TIRILLY et LE PICARD, 1973). A partir de secteurs de souches monospores, TIRILLY (communication personnelle, 1974) a isolé un "variant" possédant un pouvoir pathogène fortement atténué dont le phénomène de sectorisation a favorisé l'expression.

2 - Facteurs physiques

a) Lumière

Le *P. cinerescens* se cultive aisément à l'obscurité et, d'ailleurs, il se développe normalement dans la profondeur des tissus de l'hôte. Nous avons cependant réalisé parallèlement à la lumière et à l'obscurité des cultures de ce champignon à 22° C, en milieu de Czapek liquide (100 ml dans chaque boîte de Roux de 1 litre de capacité, maintenue à plat, sans agitation). Après 5 semaines, chaque boîte contient en moyenne :

à la lumière du jour : 160.10^7 spores et 386 mg de mycélium (poids sec)

à l'obscurité : 35.10^7 spores et 303 mg de mycélium (poids sec).

Le développement du *P. cinerescens* est donc satisfaisant dans les deux cas, la lumière semblant toutefois favoriser légèrement la croissance mycélienne et la sporulation.

Fig. 3 : *Phialophora cinerescens* : bouquets conidifères vus au microscope.

b) Aération du milieu de culture

En milieu liquide non agité, l'oxygénation est plus ou moins bonne suivant le volume de solution nutritive et la forme des récipients de culture utilisés. Si le *P. cinerescens* est capable de se développer au fond des boîtes de Roux sous une certaine épaisseur de liquide, MOREAU et CHOLLET (1963) ont apprécié l'effet bénéfique d'une bonne aération sur la croissance pondérale et la sporulation du champignon.

c) Température

- action sur la croissance du thalle : la croissance pondérale après 5 semaines de culture en milieu liquide est plus forte à 22 qu'à 11° C (MOREAU et CHOLLET, 1963). Par contre, la croissance linéaire sur milieu gélosé est la meilleure vers 11° C. A des températures plus élevées, elle est plus rapide pendant les premiers jours mais devient ensuite plus lente et irrégulière (MOREAU et AUZOLLE, 1964). Elle est nulle à 33° C.

- action sur la sporulation : elle semble optimale vers 11°C comme la croissance linéaire; à cette température, sur milieu gélosé, la sporulation est abondante, elle se poursuit régulièrement pendant longtemps et de gros bouquets de phialides, caractéristiques de cette espèce de *Phialophora* se développent sur le mycélium. Les changements brusques de température paraissent stimuler la sporulation (MOREAU, 1962). Aux températures basses (2,5 ou 5° C), les spores sont plus grandes qu'à des températures plus élevées (22 ou 28° C) (MOREAU et LE PICARD, 1971).

- action sur la germination des spores : la température optimale se situe vers 21° C; les spores, qui ne passent pas par une phase de dormance, germent alors en moins de 24 h (MOREAU et AUZOLLE, 1964).

La connaissance de ces exigences thermiques particulières aide à comprendre l'évolution de la verticilliose au cours des saisons dans une plantation d'oeillets, en particulier sa recrudescence à la fin de l'hiver et au printemps puis en automne et son ralentissement en été,sous le climat méditerranéen (MOREAU, 1963).

3 - Facteurs trophiques

Les petites spores du *P. cinerescens* contiennent peu de réserves et ne peuvent germer dans l'eau distillée mais ce champignon est peu

exigeant sur le plan nutritif.

a) Sources d'azote

Capable de se développer pendant des années sur milieu synthétique de Czapek, il y trouve l'azote sous forme de nitrate seulement. Dans les vaisseaux de son hôte, il pourra donc utiliser l'azote minéral présent dans la sève qui y circule.

b) Sources de carbone

Il est susceptible d'assimiler des glucides très divers (CHOLLET, MOREAU et MOREAU C., 1965), les uns participant normalement à la constitution des composés pariétaux des végétaux (cellulose, arabinose, galactose, xylose), les autres constituant des réserves ou provenant de leur hydrolyse (amidon, raffinose, maltose, fructose). Grâce à des aptitudes aussi variées, ce parasite saura donc trouver, dans les tissus végétaux, de multiples sources de carbone.

L'absence d'exigences nutritives particulières fait penser que le fondement de sa spécificité parasitaire sera à rechercher sur un autre plan.

En outre, selon la température, l'aération du milieu, la nature et la quantité des sucres qui lui sont fournis, le *P. cinerescens* est capable d'élaborer une saponine, un pigment jaune et de condenser des fructosanes, substances amorphes rappelant les gommes qui encombrent les vaisseaux des oeillets malades (CHOLLET et MOREAU, 1964).

c) pH du milieu de culture

Le *P. cinerescens* s'accommode bien d'un pH acide, comme celui d'un extrait de malt additionné de jus de tomate, par exemple; il est d'ailleurs capable d'alcaliniser le milieu dans lequel il se développe. MOREAU le signale en 1957 et nous l'avons nous-mêmes constaté : dans une culture agitée de *P. cinerescens*, en milieu de Czapek liquide réparti en boîtes de Roux de 1 litre à raison de 100 ml par boîte, à 22° C, la valeur du pH s'élève de 7 à 7,6 au bout de 3 à 4 semaines. Les cas d'acidification du milieu par une espèce fongique sont plus fréquents (LILLY, 1965).

4 - Confrontation avec d'autres champignons

En ce cas, on voit souvent s'établir autour des thalles du *P. cinerescens* une zone d'antibiose : il est donc capable d'élaborer des substances toxiques (dont la nature reste à préciser) responsables de cette inhibition.

Pour le *P. cinerescens*, désavantagé par sa croissance lente, cette aptitude peut être intéressante dans sa compétition avec d'autres microorganismes.

III. ORIENTATION GENERALE DU PRESENT TRAVAIL

Nous devons reconnaître que l'oeillet et le *P. cinerescens* présentent certains inconvénients comme matériel d'étude. Rappelons, par exemple, qu'il faut cultiver les oeillets avec soin pendant plusieurs mois (la première floraison demande 5 à 6 mois) pour avoir des plantes bien développées, que le développement du *Phialophora* aussi bien dans les boîtes de culture que dans la plante hôte est très lent et que son étude dans le xylème où il se localise, est délicate, car la lignification importante et l'hétérogénéité de ce tissu le rendent difficile à couper au microtome.

Cependant, les caractères morphologiques, anatomiques et biochimiques de l'oeillet, parfois en rapport avec un certain archaïsme du groupe systématique auquel il appartient, les potentialités génétiques variées de ses nombreux cultivars, mais leur uniformité dans les clones obtenus par bouturage, sont de nature à favoriser des observations, à faciliter l'interprétation de résultats ou à suggérer des hypothèses susceptibles d'orienter des recherches. D'autre part, ses caractères morphologiques mais surtout biologiques, joints à une spécificité parasitaire étroite, confèrent au *Phialophora cinerescens* une originalité certaine parmi les parasites vasculaires.

En exploitant ces particularités des deux partenaires, nous avons, dans ce travail :

- précisé la description des symptômes pathologiques et leur évolution en fonction de divers facteurs;

- suivi la pénétration et la progression du parasite;

- étudié quelques réactions de l'hôte sur le plan cytologique notamment;

- souligné la spécificité du *P. cinerescens*, la sensibilité spécifique de l'oeillet et tenté d'en approcher les mécanismes.

Qu'il nous soit permis de rendre ici hommage à Madame le Professeur MOREAU et de lui exprimer notre grande reconnaissance et notre profond attachement. Elle nous a accueillie dans son laboratoire, initiée à la mycologie et à la phytopathologie. Le présent travail a pour base ses propres recherches sur la verticilliose de l'oeillet et elle nous a fait l'honneur de nous proposer ce sujet d'étude. Elle a dirigé nos travaux et, malgré les nombreuses charges qu'elle assume, ses conseils éclairés, son attention, son appui ne nous ont jamais fait défaut.

Nous exprimons à Mademoiselle CATESSON, Professeur de Biologie végétale à l'Ecole Normale Supérieure, notre profonde et déférente gratitude. Après nous avoir ouvert son laboratoire, initiée à des techniques cytologiques qui nous étaient peu familières, aidée par ses conseils, elle a accepté de faire partie du jury de cette thèse. Des travaux effectués dans son service ont étayé et prolongé les nôtres et nous la remercions d'avoir bien voulu que soient présentés ici, plusieurs documents photographiques réalisés au microscope électronique.

Monsieur DUBOUCHET, Professeur de Physiologie végétale à Besançon, s'est intéressé à nos recherches. Il a accepté de juger ce travail et nous a fait bénéficier de ses conseils et de ses critiques. Nous tenons à l'assurer de notre respectueuse et très vive reconnaissance.

Nos essais expérimentaux ont nécessité l'utilisation d'un très grand nombre d'oeillets. Les boutures nous en ont été gracieusement fournies par Monsieur et Madame CALCAGNO qui, des Alpes Maritimes, nous en ont expédié plusieurs milliers; par Monsieur et Madame MALLEJAC de Plougastel-Daoulas; par Monsieur et Madame GUILLERME de Languidic. Pour leur compréhension et leur amabilité, nous les remercions sincèrement.

Monsieur PEREAU-LEROY, du Service de Radioagronomie du C.E.A. de Cadarache, nous a procuré des cultivars d'oeillets obtenus par irradiation de méristèmes et nous l'en remercions vivement.

Nous devons aussi beaucoup au personnel technique qui a bien souvent allégé notre tâche matérielle, à des stagiaires qui, séjournant au laboratoire, nous ont occasionnellement apporté leur aide, à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire et nous leur en savons gré.

Nous remercions chaleureusement tous les chercheurs du laboratoire de Biologie végétale de Brest pour l'amitié qu'ils nous ont manifestée et pour avoir bien voulu, malgré leurs occupations personnelles, s'intéresser à ce travail.

Monsieur PELHATE a accepté de participer à la constitution du jury. Pour les remarques dont il nous a fait part et la sympathie qu'il nous a témoignée, nous lui adressons de sincères remerciements.

Nous devons une mention particulière à Monsieur MOREAU, Maître de Recherches au C.N.R.S., qui, avec une inlassable amabilité, nous a fait bénéficier au cours de ce travail, de son savoir, de ses conseils; son aide dans l'illustration photographique de ce mémoire nous a été précieuse. Nous le prions de croire en notre vive reconnaissance.

Monsieur le Professeur KERN, de Zurich, a bien voulu, à plusieurs reprises, accepter la publication de nos articles dans la revue Phytopathologische Zeitschrift. Malgré ses nombreuses occupations, il a examiné ce travail et nous fait l'honneur de participer aux travaux de notre jury. Qu'il veuille bien trouver ici, l'expression de notre profond respect et de notre reconnaissance pour le bienveillant accueil qu'il nous a réservé.

CHAPITRE I

MATERIEL ET TECHNIQUES

S O M M A I R E

I. L'OEILLET ET SA CULTURE

A) CULTIVARS UTILISES

B) MORPHOLOGIE ET ANATOMIE

C) MODES DE CULTURES

D) CONSTITUTION DES LOTS D'OEILLETS DANS LES ESSAIS PRATIQUES AVEC DES PLANTES ISSUES DE BOUTURES

II. LE PARASITE ET L'OBTENTION DE L'INOCULUM

A) ISOLATS UTILISES

B) CULTURE DU PARASITE ET OBTENTION DE L'INOCULUM

III. MODES D'INFECTION

A) PLANTES ISSUES DE SEMIS, CULTIVEES ASEPTIQUEMENT EN TUBES

B) PLANTES ISSUES DE BOUTURES CULTIVEES EN SERRE

IV. RECHERCHE DU *PHIALOPHORA CINERESCENS* DANS L'OEILLET ET DANS LE SUBSTRAT

A) OBSERVATION MICROSCOPIQUE DES TISSUS DE L'HOTE

B) MISE EN CULTURE DE COUPES SERIEES DE LA PLANTE-HOTE

C) RECHERCHE DU *P. CINERESCENS* DANS LE SUBSTRAT

V. TECHNIQUES CYTOLOGIQUES

A) FIXATION

B) CONFECTION DES COUPES

C) COLORATION DES COUPES

D) DETECTION DES PHENOLS

E) MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE

I. L'OEILLET ET SA CULTURE

A) CULTIVARS UTILISES

La plupart de nos essais ont été réalisés avec des oeillets de type américain, sports issus du "William Sim", tels que :

"New Red Sim", "Coronation", "Scania", à fleur rouge;

"White Sim", à fleur blanche;

"Lolita", à fleur rose striée de rouge (c'est un sport de "Ember-Sim", lui-même mutant de "William Sim").

Nous avons utilisé l'oeillet "Sim Jacqueline" à fleur orange striée de rouge et trois de ses mutants obtenus à Cadarache par irradiation des méristèmes apicaux : un à fleur rouge, un à fleur jaune, un à fleur jaune striée de rouge .

Les cv. "Calendal", "41" et "Fanny" sont des hybrides entre types américain et niçois. "Fanny" doit ses fleurs blanches à la déchimérisation par irradiation d'un hybride à fleurs roses.

En plus de ces cultivars multipliés par boutures, nous avons introduit dans nos essais des oeillets issus de la germination de graines :

"Triomphe" (Vilmorin);

"Enfant de Nice" rouge (Vilmorin);

"Chabaud Carmen" (Clause).

B) MORPHOLOGIE ET ANATOMIE

Nous les préciserons pour les oeillets le plus souvent utilisés dans nos essais, c'est-à-dire pour les variétés de type américain comme "Scania", "Coronation" et "Lolita", multipliés par bouturage et cultivés en serre tempérée. En particulier, l'étude détaillée du xylème de la plante-hôte est indispensable en raison de la localisation vasculaire du parasite.

1 - Morphologie

A la différence des pratiques culturales courantes, nous ne pinçons pas la tige principale : elle conserve donc sa dominance et nous retardons ainsi la ramification de la plante, ce qui est plus commode pour suivre la progression du parasite, observer l'évolution des symptômes et en donner une expression chiffrée.

Les entre-noeuds de cette tige sont d'inégale longueur : au moment du prélèvement sur le pied-mère, les boutures possèdent de 7 à 10 paires de feuilles : 3 à 4 paires étalées et 4 à 6 paires en développement dans le bourgeon terminal. Au cours du bouturage, la croissance des entre-noeuds présents dans la pousse qu'on met à enraciner, est perturbée : ils s'allongent peu et jusqu'à la 7e ou la 8e paire de feuilles de la plante adulte, les noeuds restent rapprochés; le 3e et le 4e entre-noeuds notamment ont souvent moins de 1 cm de long; les suivants sont de longueur croissante.

2 - Tracés vasculaires et structure du xylème (PERESSE, 1971)

La juxtaposition des faisceaux vasculaires descendant des feuilles opposées forme, dans la tige, quelques centimètres au-dessous de l'apex, un manchon cylindrique de xylème primaire de 50 µ d'épaisseur environ, découpé au niveau des noeuds par les brèches foliaires (fig. 4). Le diamètre intérieur des éléments conducteurs va de 5 à 10 µ pour les vaisseaux annelés et spiralés du protoxylème; il peut atteindre 18 µ pour ceux du type ponctué du métaxylème. Ils sont mêlés à des cellules de parenchyme non lignifié.

Dans les parties plus âgées de la tige, le xylème secondaire se juxtapose au xylème primaire, son épaisseur augmente au fur et à mesure du fonctionnement du cambium. Ses vaisseaux, du type ponctué, sont disposés isolément, en files radiales ou en petits groupes. Ils sont formés d'éléments plus courts, mais plus larges (de 15 à 25 µ de diamètre) que ceux du xylème primaire.

Dans les variétés étudiées, le xylème secondaire différencié la première année est très lignifié, mais on remarque que les vaisseaux

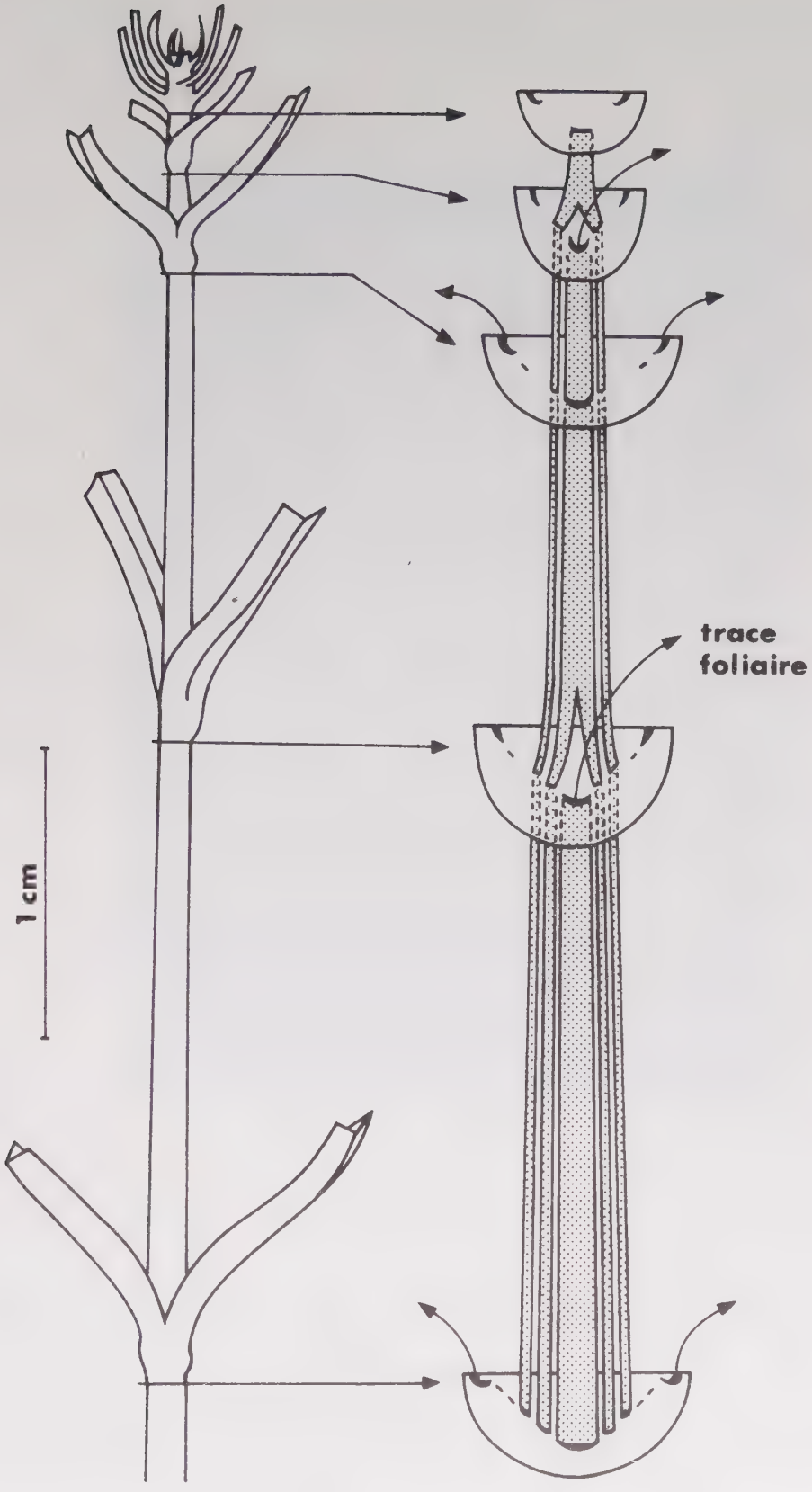


Fig. 4 : Schéma du tracé vasculaire primaire au sommet d'une tige d'oeillet.

restent entourés d'un manchon de cellules à parois cellulosiques minces qui leur sont étroitement accolées (fig. 5) et qui rappellent les cellules associées aux vaisseaux (c.a.v.) décrites par CZANINSKI (1968) dans le bois de robinier.

Ces oeillets étant multipliés par bouturage, leur système racinaire est formé de racines adventives qui naissent au niveau du cal cicatriciel; les vaisseaux de ces racines se prolongent directement dans le xylème secondaire de la tige mais ne sont jamais en continuité avec ceux du xylème primaire préexistant dans la bouture. Les vaisseaux primaires annelés et spiralés sont rapidement écrasés par le développement du xylème secondaire qui comprend des vaisseaux ponctués ou réticulés, au tracé parfois sinueux, au sein d'un parenchyme ligneux abondant et peu lignifié.

Dans la plante, l'eau circule dans les parois squelettiques, passe de cellule à cellule mais surtout monte jusqu'à son sommet par les vaisseaux du xylème qui constituent un passage de moindre résistance. Dans ces capillaires, l'eau s'écoule en un flux laminaire (WAGGONER et DIMOND, 1954) qui suit la loi de Poiseuille (DIMOND, 1967). Les éléments des vaisseaux parfaits communiquent entre eux par de larges perforations : il se forme ainsi de longs conduits où la sève circule librement et où des corpuscules de petite taille peuvent être entraînés. Des parois transversales y subsistent cependant de place en place. Si elles sont difficiles à repérer et sont d'ailleurs trop distantes les unes des autres pour qu'on puisse mesurer leur écartement dans un champ microscopique, on peut estimer la longueur maximale des vaisseaux à un niveau quelconque de la plante par la méthode suivante (PERESSE, 1974), voisine de celle décrite par GREENIDGE (1952) : l'organe végétal est coupé à la hauteur voulue et sa section engagée dans un tube de caoutchouc où l'on insuffle de l'air sous pression modérée. Une seconde section, pratiquée à distance, est maintenue sous l'eau. A cette extrémité distale, des segments de 1 cm sont ôtés successivement jusqu'à ce que l'on obtienne une émission de bulles à partir du tissu ligneux (fig. 6). L'air ne pouvant traverser les parois transversales (BENNET *et al.*, 1927; SCHOLANDER *et al.*, 1955, 1957), leur apparition signifie qu'il existe à ce moment des vaisseaux ouverts (un au moins) d'un bout à l'autre du tronçon d'organe encore intact.

Fig. 5 : Coupe longitudinale du xylème secondaire d'une tige d'oeillet.

v. : vaisseau ponctué
c.a.v. : cellule associée au vaisseau
p.l. : parenchyme lignifié

La sève peut aussi passer latéralement d'un élément vasculaire à un autre, d'autant plus aisément chez l'oeillet que le xylème n'est pas constitué de faisceaux séparés mais forme un manchon cylindrique continu dans la tige, même au stade primaire. Si une tige d'oeillet est brisée et n'est plus rattachée à la partie basale que par une bande étroite de xylème, elle montre seulement une perte passagère de turgescence : le transfert latéral de l'eau au-dessus de la section est manifeste dans ce cas.

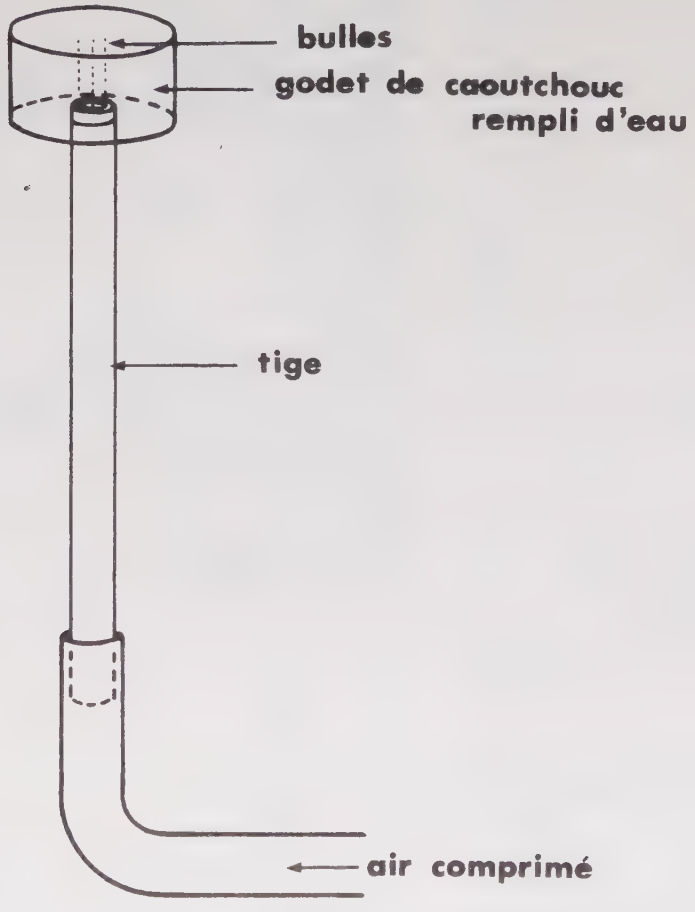


Fig. 6 : Dispositif pour mesurer la longueur maximale des vaisseaux dans une tige.

C) MODES DE CULTURE

1 - Enracinement des boutures

Dès leur prélèvement sur les pieds-mères, les boutures sont mises à enraciner dans de la perlite horticole humide et placées en micro-phytotron dans les conditions suivantes :

température : 22° C le jour, 18° C la nuit;
éclairement : 12 h de jour (10 000 lux) alternant avec 12 h d'obscurité;
hygrométrie : 90 % d'humidité, taux maintenu constant par pulvérisation d'eau en fin brouillard.

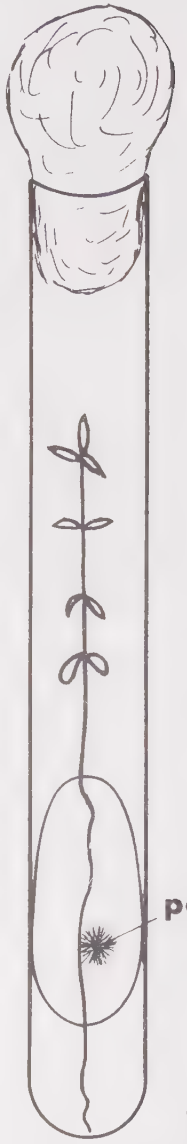
Grâce au maintien d'un taux d'humidité élevé, le flétrissement des boutures n'est plus à craindre et "l'habillage" devient inutile; or, l'élimination du sommet des feuilles pour réduire la transpiration privait aussi la jeune plante de l'activité photosynthétique d'une importante surface foliaire. Favorisé, en outre, par l'usage d'une poudre aux hormones (Rôotone), l'enracinement est très satisfaisant au bout de trois semaines.

Les jeunes oeillets sont alors mis en pots. Si la transplantation doit être différée, les boutures enracinées peuvent être conservées sans inconvénient plusieurs mois à 2° C, enveloppées par paquets de 10 ou 15 en sachets de polyéthylène.

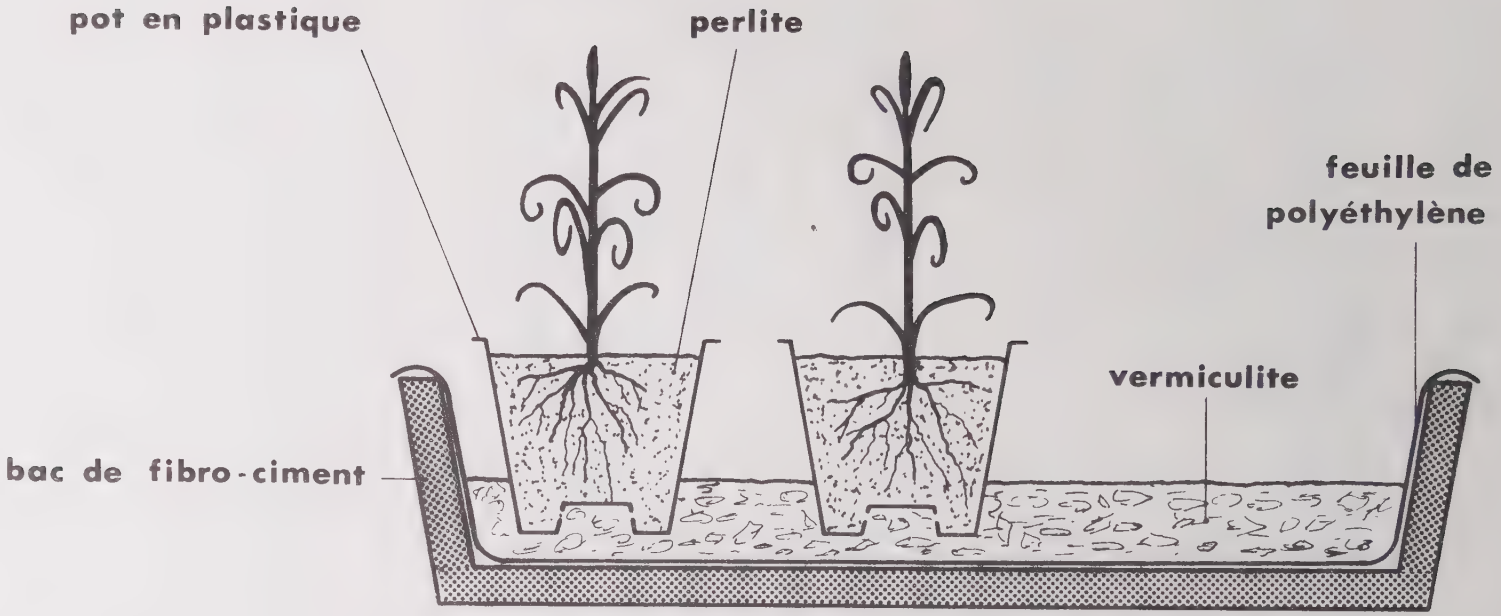
2 - Culture en serre

a) Disposition des bacs de culture

Les bacs surélevés sont tapissés d'une feuille étanche de polyéthylène qui les isole les uns des autres et évite notamment la dispersion des spores infectieuses entraînées par l'eau d'arrosage, à partir d'un lot de plantes infectées. Le fond est garni d'une couche de vermiculite de quelques centimètres d'épaisseur, maintenue humide, et dans laquelle on enfonce la base perforée des pots de plastique contenant les oeillets (fig. 7).



CULTURE DE PLANTULES EN TUBES.



DISPOSITION DES BACS DE CULTURE
EN SERRE.

Fig. 7 .MODES DE CULTURE DES ŒILLETS.

b) Substrats de culture

Les plantes sont rempotées dans de la perlite horticole, fabriquée à partir de rhyolite. Ce substrat artificiel, renouvelé pour chaque culture, est dépourvu de la flore habituelle du sol et n'héberge donc pas, au départ, de parasites de l'oeillet : son usage est une sécurité supplémentaire dans la réalisation de nos infections expérimentales. Sous l'eau courante, les grains de perlite se séparent assez facilement des racines, ce qui permet d'y repérer d'éventuelles altérations. Bien que renouvelée pour chaque plantation, la perlite constitue, d'un essai à l'autre, un substrat homogène dans sa texture et sa composition.

En outre, ses caractéristiques, étudiées et comparées à celles d'autres substrats au Phytotron de Gif-sur-Yvette par Melle SCHEIDECKER (communication personnelle), sont intéressantes : elle a un très grand pouvoir de rétention de l'eau, n'alcalinise que légèrement la solution nutritive qui y est apportée; elle ne peut être considérée comme chimiquement neutre car elle libère du calcium, retient du potassium et du magnésium, mais elle ne modifie pas la concentration en phosphate et constitue un substrat très convenable pour la culture sans sol des plantes.

c) Solution nutritive

Les oeillets en sont arrosés deux fois par semaine; la quantité apportée varie selon l'état de développement des plantes. Un litre de cette solution contient :

Macroéléments (g/l)		Oligoéléments (mg/l)	
KNO_3	0,225		
KH_2PO_4	0,3	KCl	3
NH_4Cl	0,225	H_3Bo_3	3,3
$MgSO_4$, $7H_2O$	0,45	$MnSO_4$, H_2O	1,8
$(NH_4)_2$ SO_4	0,3	$ZnSO_4$, $7H_2O$	0,3
Ca $(NO_3)_2$	1,2	$(NH_4)_6$ Mo_7O_{24}.	0,3
EDTA Na, Fe	0,045	$CuSO_4$, $5H_2O$	0,15

3 - Culture en microphytotron

Dans cette enceinte, on peut contrôler en permanence, température, hygrométrie, éclairement. Nous avons usé de ces possibilités dans certains essais, les oeillets étant cultivés en pots de perlite arrosée de solution nutritive. Mais le volume limité de ce microphytotron ne permet d'y introduire qu'un nombre restreint de plantes (50 à 60).

4 - Culture axénique de plantules en tubes

Ce mode de culture nécessite la désinfection préalable des graines et l'usage de récipients et d'un milieu de culture adaptés.

a) Désinfection des graines

Après passage à l'éthanol 95 qui joue surtout un rôle de mouillant, les graines baignent 15 minutes dans une solution d'hypochlorite de calcium (50 g/l) puis subissent trois rinçages successifs de 5, 15 et 30 minutes dans l'eau stérile.

b) Récipients et milieu de culture

Pour permettre à la plantule de se développer en hauteur et pour lui fournir une quantité suffisante de substrat, nous avons utilisé des tubes de 30 cm de long et de 2,5 cm de diamètre, bouchés avec du coton cardé.

Dans chaque tube, on introduit 20 ml d'un milieu contenant :

- solution minérale utilisée pour l'arrosage des oeillets (voir ci-dessus)	1 000 ml
- saccharose	0,5 g
- agar-agar	12 g

A la sortie de l'autoclave, les tubes sont refroidis en position inclinée, de façon que la surface du milieu gélosé forme un biseau de 10 cm de long environ.

c) Ensemencement

Une graine désinfectée est déposée dans chaque tube, à la partie supérieure du biseau de gélose. Placés debout dans des portoirs, les tubes sont maintenus en chambre climatisée (éclairement : 1 000 lux 12 h/jour, température : 22° C).

Remarques

. L'existence de ce biseau permettra l'inoculation de la plantule au niveau de la racine (fig. 7) au moment voulu.

. L'introduction d'une faible quantité de saccharose dans le milieu de culture favorise légèrement le développement du *P. cinerescens* qui, s'il est capable de croître sur milieu minéral gélosé, y revêt un aspect si ténu qu'on distingue mal s'il a pris contact ou non avec la racine.

D) CONSTITUTION DES LOTS D'OEILLETS DANS LES ESSAIS PRATIQUES AVEC DES PLANTES ISSUES DE BOUTURES

Si les boutures sont récoltées en même temps sur les pieds-mères et enracinées dans des conditions bien contrôlées, elles ne sont pas toutes identiques et les oeillets qui en sont issus ne se développent pas uniformément. Cette hétérogénéité rend difficile la comparaison des résultats expérimentaux. C'est pourquoi, au moment de la mise en expérience (notamment dans le cas où des mesures de l'allongement des tiges feuillées sont envisagées), des plantes de taille voisine sont choisies et réparties de sorte que les hauteurs moyennes des différents lots soient équivalentes, à 1 cm près environ. Malgré cette précaution, des écarts de taille moins importants mais encore notables se manifestent entre les oeillets au cours des semaines suivantes.

II. LE PARASITE ET L'OBTENTION DE L'INOCULUM

A) ISOLATS UTILISES

Nous avons disposé de 10 isolats de *Phialophora cinerescens* au pouvoir pathogène plus ou moins marqué, d'origines géographiques différentes

(région méditerranéenne, Bretagne, Allemagne), tous obtenus d'oeillets. Dans la plupart de nos infections expérimentales, nous avons utilisé un isolat obtenu en 1968 de plantes malades cultivées dans la région de Nice : il manifeste une forte virulence que la culture *in vitro* n'atténue pas.

B) CULTURE DU PARASITE ET OBTENTION DE L'INOCULUM

En raison des particularités biologiques du *Phialophora cinerescens* exposées dans l'introduction, nous l'avons conservé en mycothèque ou cultivé pour les besoins de nos expériences dans les conditions suivantes :

- milieu de culture : Czapek* ou extrait de malt à 2 %, gélosé à 2 %;
- récipients de culture : tubes à essais ou boîtes de Roux de 1 litre;
- incubation : 1 à 2 mois à la température de 11° C et à l'obscurité.

On obtient de cette façon des thalles à croissance régulière, au mycélium ras dont la sporulation intense se manifeste par la présence à sa surface de multiples glomérules noirs et luisants de myxospores.

Selon le mode d'infection pratiqué, l'inoculum est simplement prélevé dans ces cultures à l'extrêmité d'un fil ensemenceur ou bien mis en suspension dans l'eau soit par lessivage de la surface du thalle (seules les spores sont entraînées), soit par broyage au mixer (des fragments de mycélium et de milieu gélosé sont alors mêlés aux spores).

III. MODES D'INFECTION

A) PLANTES ISSUES DE SEMIS, CULTIVEES ASEPTIQUEMENT EN TUBES

Prélevées à l'aide d'un fil ensemenceur, des spores sont déposées à la surface du milieu gélosé à quelques millimètres des racines pour éviter de les blesser et à 2 cm au moins au-dessous du collet.

---

* Composition : $NaNO_3$: 2 g - K_2HPO_4 : 1 g - KCl : 0,5 g - $MgSO_4$, 7 H_2O : 0,5 g - $FeSO_4$, 7 H_2O : 0,01 g - saccharose : 30 g - eau q.s.p. 1 000 ml.

B) PLANTES ISSUES DE BOUTURES, CULTIVEES EN SERRE

L'infection est pratiquée sur des oeillets de 2 mois au moins; à ce moment, au talon de la bouture, s'est formé un cal cicatriciel qui porte des racines nombreuses et bien développées.

1 - Infection par les racines

L'inoculum est une suspension contenant (sauf cas particuliers qui seront alors précisés) 30.10^6 spores de *P. cinerescens* par ml, préparée soit par broyage d'une culture du parasite, soit par lessivage de sa surface : nous avons obtenu des résultats analogues avec les deux types de suspensions ce qui confirme les travaux de GARIBALDI (1969).

a) infection sans blessures volontairement provoquées (Ir)

Au pied de chaque oeillet on arrose le sol avec 30 ml de suspension; petites et facilement entraînées par l'eau, les spores pénètrent rapidement dans le substrat. Bien que la densité de l'inoculum dans le sol soit ainsi très élevée, cette méthode assure l'infection des plantes dans les conditions les plus proches de celles rencontrées dans la nature et nous l'avons couramment utilisée.

b) Infection avec blessures provoquées (Irb)

- Irb_1 : l'oeillet est déraciné avec précaution (de nombreuses radicelles sont toutefois rompues). Le système racinaire est plongé une minute dans la suspension infectieuse et le plant est rempoté aussitôt.

- Irb_2 : on réalise des blessures plus graves en opérant de la même façon qu'en Irb_1, mais en sectionnant, en plus, une ou deux grosses racines à 2 ou 3 cm du collet avant d'infecter.

- Irb_3 : une racine est dégagée du substrat de culture, lavée, puis plongée dans une suspension de spores et coupée sous la surface du liquide. On évite ainsi la pénétration d'air qui interromprait le courant ascensionnel dans les vaisseaux. La section est maintenue plongée dans la suspension infectieuse pendant 24 h., puis la racine est à nouveau enfouie dans la perlite.

2 - Infection par la tige (fig. 8)

Les suspensions utilisées contiennent seulement les spores du parasite (15.10^6 spores/ml).

a) Inoculation par injection (Iti)

Avec une aiguille hypodermique, on traverse la tige de part en part, le xylème est donc lésé en deux endroits. On injecte dans cette blessure quelques gouttes de la suspension infectieuse : des spores sont ainsi introduites directement dans les vaisseaux.

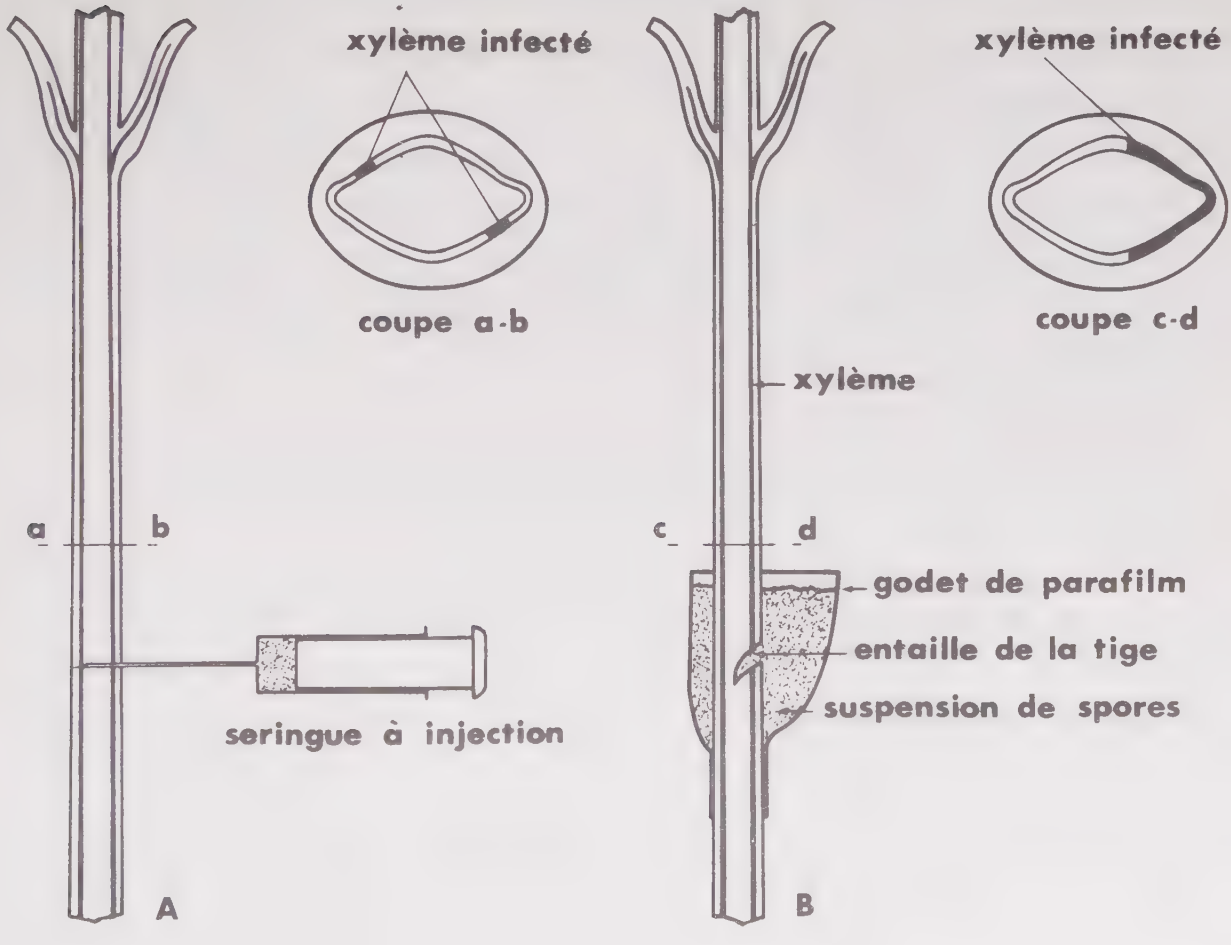


Fig. 8 : Dispositifs pour l'infection des tiges d'oeillet.

A : par injection (Iti)

B : par entaille (Ite)

b) Inoculation par une entaille (Ite)

A la hauteur voulue, sur la tige soigneusement nettoyée à l'éthanol, on adapte un godet façonné en parafilm que l'on remplit de la suspension de spores. Sous la surface du liquide, la tige est entaillée profondément; cela évite la pénétration d'air dans les vaisseaux sectionnés où les spores sont aspirées peu à peu avec le liquide (méthode proche de celle proposée par GREGORY en 1969).

IV. RECHERCHE DU *PHIALOPHORA CINERESCENS* DANS L'OEILLET ET DANS LE SUBSTRAT

A) OBSERVATION MICROSCOPIQUE DES TISSUS DE L'HOTE

Sur des coupes minces, on peut voir au microscope le mycélium et les spores du *P. cinerescens* dans les vaisseaux de l'oeillet, l'observation en étant facilitée par une coloration appropriée (bleu coton). Cependant dans le cas d'infection naturelle, au début de l'installation dans la plante, il n'occupe que quelques rares vaisseaux où sa répartition est bien souvent discontinue. C'est pourquoi, à ce stade, cette méthode de recherche est longue et très aléatoire.

B) MISE EN CULTURE DE COUPES SERIEES DE LA PLANTE-HOTE

Des coupes transversales successives de quelques millimètres d'épaisseur sont prélevées aseptiquement dans la plante et déposées sur un milieu nutritif approprié. Après incubation, le parasite se développe sur le milieu gélosé à partir des tissus qui l'hébergeaient et est identifiable.

Pour rendre cette méthode satisfaisante, quelques détails techniques ont dû être mis au point en raison, d'une part des particularités morphologiques et biologiques du *P. cinerescens* (identification difficile aux températures d'incubation courantes, croissance lente, aptitudes médiocres à la compétition) et, d'autre part, de la présence de microorganismes contaminants non pathogènes mais à croissance rapide *in vitro*, susceptibles d'inhiber ou de masquer le développement du parasite recherché.

- Contaminants superficiels : la surface des organes végétaux en contact avec le sol ou l'air sont forcément souillés par de nombreux germes. Les racines,selon leur diamètre, sont donc stérilisées superficiellement par flambage rapide à l'éthanol ou bien par bain dans une solution d'hypochlorite de calcium suivi de rinçages à l'eau stérile. Les tiges sont flambées à l'éthanol puis décortiquées jusqu'au cambium (ou jusqu'au sclérenchyme seulement, s'il est bien développé).

- Contaminants internes : la présence de microorganismes non pathogènes a souvent été signalée dans les racines surtout, mais aussi dans les tiges. HELLMERS (1958), JENKINS (1959), NELSON et DICKEY (1963) en ont isolé d'oeillets précisément et nous y avons rencontré aussi de nombreuses espèces fongiques et bactériennes. Si elles se trouvent dans les coupes en même temps que le *P. cinerescens*, celui-ci, désavantagé par la lenteur de son développement, risquera de passer inaperçu.

EBBEN (1962) préconise l'addition au milieu de culture, de violet **cristal** à 0,01 % car ce colorant, agissant sur les bactéries Gram+, inhibe la multiplication de la plupart des espèces saprophytes.

NILSSON (1964) pratique l'isolement du *P. cinerescens* sur milieu à la pomme de terre ou sur eau gélosée additionnée d'auréomycine et de streptomycine, avec incubation à 3° C ; mais on ne peut, dans ces conditions, relever les résultats qu'au bout de 6 à 10 semaines.

Dans nos essais, nous avons le plus souvent utilisé un milieu gélosé de malt à 2 % additionné de jus de tomate (3 %), avec incubation à 11° C : l'acidité de ce milieu est défavorable au développement de nombreuses bactéries et de certains champignons mais ne gêne pas le *P. cinerescens*; à 11° C, la croissance des microorganismes est généralement ralentie et c'est, par contre, la température optimale pour celle du *Phialophora* et pour sa sporulation, avec formation de gros bouquets conidifères dont la présence évite toute erreur d'identification. De plus, son aspect cultural, très caractéristique à cette température, permet normalement de le reconnaître par observation directe de la culture au microscope stéréoscopique, ce qui est un gain de temps appréciable lorsque des centaines de coupes doivent être examinées. Dans ces conditions, la lecture des résultats ne peut encore se faire qu'après un délai de 3 ou 4 semaines.

La mise en culture à partir de coupes sériées permet de préciser la localisation du parasite dans le sens vertical mais ne nous renseigne

pas sur le nombre et l'emplacement des vaisseaux infectés; nous ne savons pas non plus avec quelle abondance ni sous quelle forme (spores ou mycélium) le champignon est présent dans les tissus de l'hôte. SAALTINK (1955) pour la fusariose du lupin ou MATTA et DIMOND (1963) pour la fusariose de la tomate, évaluent l'importance relative de l'invasion parasitaire, par broyage de la plante au mixer, mise en culture d'une dilution de ce broyat et dénombrement des fragments infectés. Cette technique n'est guère applicable ici car le bois de l'oeillet est trop épais et trop dur pour être broyé de façon assez homogène, ce qui risque d'entraîner des erreurs d'appréciation graves.

C) RECHERCHE DU *PHIALOPHORA CINERESCENS* DANS LE SUBSTRAT

Nous avons adopté une technique de dilution qui fournit des résultats qualitatifs et quantitatifs, en l'adaptant à ce champignon peu compétitif vis-à-vis de la flore abondante et variée de la rhizosphère de l'oeillet :

4 grammes de perlite sont vigoureusement agités dans 50 ml d'eau stérile. Des boîtes de Pétri reçoivent chacune 1 ml de cette suspension diluée 100 ou 1000 fois, sur lequel on coule un milieu gélosé de malt 1 % à la tomate maintenu en surfusion à 45° C. Les boîtes sont mises à incuber pendant 3 semaines à 11° C. Ici encore, les conditions de température et le milieu de culture favorisent le champignon recherché tout en limitant la croissance de nombreuses espèces concurrentes.

V. TECHNIQUES CYTOLOGIQUES

A) FIXATION

Les fragments de tissus prélevés dans la plante ont été le plus souvent fixés par un mélange de formol, d'alcool éthylique et d'acide acétique (F.A.A.) dans les proportions 85/10/5 (v./v.). Sa pénétration est accélérée par passage sous pression réduite pendant quelques minutes. Ce fixateur convient bien à l'étude des parois squelettiques, assure une bonne fixation des noyaux, mais peut provoquer une contraction du cytoplasme.

En vue d'une coloration à l'hématoxyline ferrique, les pièces sont fixées par le mélange de Regaud (LANGERON, 1949). Le traitement au bichromate de potassium entraîne l'insolubilisation des lipides hétérophasiques (LISON, 1960), notamment des phospholipides, et assure donc la préservation des structures qui en sont riches comme les mitochondries.

B) CONFECTION DES COUPES

Des coupes transversales ou longitudinales de 10 à 20 µ d'épaisseur sont réalisées au microtome dans les fragments végétaux soit après congélation sur une platine réfrigérée (Cryotome 1300 de Leitz), soit après déshydratation et inclusion dans la paraffine.

C) COLORATION DES COUPES

1 - Bleu Coton au lactophénol

Il colore en bleu les éléments fongiques qui sont ainsi plus faciles à observer, notamment dans les vaisseaux ligneux dont la paroi reste incolore.

2 - Carmin aluné-vert d'iode (LANGERON, 1949)

Il n'est utilisé que pour la coloration des parois squelettiques mais offre un bon contraste entre les tissus subérifiés et lignifiés dont les parois cellulaires sont colorées en vert et les tissus dont les parois cellulaires, colorées en rose, sont essentiellement cellulosiques.

3 - Rouge de ruthénium à 1/5000 (LANGERON, 1949)

Ce colorant a souvent été considéré comme spécifique des matières pectiques. Plus précisément, il met en évidence la présence de fonctions acide carboxylique que possèdent la plupart des substances pectiques mais dont elles n'ont pas l'exclusivité (CLOWES et JUNIPER, 1968). En outre, le manque de coloration n'est pas une preuve de l'absence de pectines car une concentration insuffisante ou la présence de diverses substances,

d'ailleurs mal définies, peuvent empêcher la coloration rouge d'apparaître (JENSEN, 1962).

4 - Hydroxylamine-chlorure ferrique (JENSEN, 1962)

Cette coloration, très spécifique, est basée sur la réaction du chlorure d'hydroxylamine en solution alcaline, avec les esters méthyliques des pectines. L'acide hydroxamique formé produit des complexes rouges avec les ions ferriques.

5 - Chloro-iodure de zinc (JENSEN, 1962)

Il colore en bleu les parois riches en cellulose. Cette réaction se produit aussi avec les hemicelluloses. Si la paroi contient en plus des substances comme la lignine, la subérine, elle apparaît jaune ou rouge.

6 - Phloroglucine chlorhydrique (LANGERON, 1949)

Ce réactif colore la lignine en rouge; cette coloration s'atténue progressivement dans les préparations permanentes et disparait par chauffage. LANGERON (1949) signale qu'il colore des gommes de la même façon, mais BRUNEL (1949) fait remarquer que la coloration rouge alors obtenue avec des pentoses et pentosanes est stable à la chaleur.

7 - Réaction de Maüle (JOHANSEN, 1940; BRUNEL, 1949)

Les actions successives du permanganate de potassium, de l'acide chlorhydrique et de l'ammoniaque donnent aux tissus lignifiés une coloration rouge foncé. La réaction est positive avec tous les bois d'Angiospermes mais ne se produit pas avec celui des Gymnospermes où les parois lignifiées prennent une teinte brune mal définie. Elle ne caractérise donc pas tous les types de lignine.

8 - Acide périodique-Schiff (A.P.S.) (JENSEN, 1962)

Cette réaction permet de caractériser les polysaccharides insolubles qui se colorent en rouge pourpre. Les parois cellulaires, par exem-

ple, sont donc très nettes, mais la coloration ne permet pas de différencier les divers carbohydrates qui les constituent.

9 - Vert de méthyle-pyronine (LISON, 1960)

Cette méthode est utilisée pour caractériser la présence des A.D.N. qui se colorent en vert et des A.R.N. qui se colorent en rouge et elle permet une bonne observation des noyaux. Les parois cellulaires sont également colorées : NOUGAREDE (1969) signale, entre autres, l'affinité de la pyronine pour les parois épaisses des éléments du xylème secondaire. Dans nos coupes, une différenciation convenable fait apparaître rouges les parois où la lignine est très abondante et vertes, celles où la cellulose prédomine, tandis que des teintes intermédiaires d'un violacé tendant vers le rouge ou le bleu semblent dépendre des proportions des composés pariétaux présents.

10 - Hématoxyline ferrique de Regaud (LANGERON, 1949)

Cette technique a été utilisée pour mettre en évidence les mitochondries qui se colorent en bleu-noir. Après mordançage par l'alun de fer et d'ammonium, les structures cellulaires ayant fixé des ions ferriques sont teintées par l'hématoxyline : les coupes sont alors surcolorées; leur différenciation par l'alun de fer et d'ammonium est assez délicate à obtenir.

D) DETECTION DES PHENOLS

Elle est effectuée sur coupes longitudinales de tissus frais, faites à la main et assez épaisses pour contenir des cellules intactes.

1 - Chlorure ferrique (JOHANSEN, 1940)

Il forme, avec les tannins, un précipité bleu-vert ou noirâtre, mais tous les phénols ne donnent pas cette réaction.

2 - Réactif de Folin-Ciocalteu (FOLIN et CIOCALTEU, 1927)

Cette réaction est basée sur l'oxydabilité des substances phénoliques : le mélange de phosphomolybdate et de tungstate de sodium est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène.

3 - Paranitraniline diazotée (STURM et SCHEZA, 1964)

En milieu alcalin, il se produit une réaction de copulation entre les acides - phénol et les sels de diazonium avec apparition de produits colorés. La réaction a lieu aussi avec des composés hétérocycliques et les amines.

4 - Réaction de Hoepfner

Elle a été décrite (HOEPFNER, 1932) pour la caractérisation de l'acide caféique et de l'acide chlorogénique, mais de nombreux autres composés phénoliques réagissent. Cette réaction de nitrosation, modifiée par VORSATZ (1942), a été adaptée à la détection des phénols dans les coupes de tissus frais de végétaux par REEVE (1950) dont nous avons utilisé la méthode. L'apparition d'une coloration rouge-cerise indique la présence d'orthodihydroxyphénol.

E) MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE

L'examen de la fluorescence naturelle ou de celle induite par les fluorochromes a été effectuée avec un microscope Leitz Ortholux équipé de filtres de transmission de rayons ultra-violets VG_1 et BG_{38} et de filtres d'arrêt K 470 ou K 490.

1 - Fluorescence naturelle ou primaire

Certains tissus végétaux manifestent ce type de fluorescence. Dans nos conditions d'observation les parois des éléments lignifiés du xylème de l'oeillet sain apparaissent bleu-clair. Toute modification de la teinte de fluorescence indique une modification de la nature de ces parois.

2 - Fluorescence induite ou secondaire

Nous avons tenté de l'utiliser pour "marquer" le parasite et faciliter sa détection dans les tissus de l'hôte. A cette fin, le *P. cinerescens* est cultivé en milieu de Czapek liquide et agité, additionné d'un fluorochrome : soit le Calcofluor white M2R new à 150 mg/l (il montre une nette toxicité à une concentration plus élevée) soit le Tinopal B.O.P. à 200 mg/l. Au bout de 7 jours de culture, après lavage à l'eau stérile, les éléments fongiques présentent une fluorescence jaune-vert avec le Calcofluor, vert brillant avec le Tinopal.

Dans notre travail, l'usage des fluorochromes s'est révélé assez décevant car il rencontre deux inconvénients majeurs : la fluorescence naturelle du xylème où se localise justement ce parasite vasculaire, nuit au contraste et gêne l'observation; c'est aussi ce que déplore POMERLEAU (1970) qui a également testé l'usage du Calcofluor pour détecter le *Ceratocystis ulmi* dans le bois d'orme. En outre, si les hyphes et les spores du *P. cinerescens* acquièrent aisément une fluorescence secondaire, celle-ci s'atténue rapidement quand le champignon poursuit son développement dans un milieu dépourvu de fluorochrome (les tissus de l'hôte par exemple).

CHAPITRE II

EXPRESSION DES SYMPTOMES EN INFECTION EXPERIMENTALE

S O M M A I R E

I. SYMPTOMES SELON LE MODE D'INFECTION AU NIVEAU DES RACINES

A) INFECTION DU TYPE Ir

1 - Symptômes externes

2 - Symptômes internes

3 - Corrélation entre symptômes foliaires et vasculaires

B) AUTRES MODES D'INFECTION PAR LES RACINES

1 - Conditions expérimentales

2 - Résultats

3 - Conclusion

II. FACTEURS MODIFIANT L'EVOLUTION DES SYMPTOMES

A) FACTEURS CONCERNANT LA PLANTE

1 - Sensibilité variétale

2 - Age des oeillets au moment de l'infection

B) FACTEURS CONCERNANT LE PARASITE

1 - Densité de l'inoculum

2 - Persistance de l'inoculum dans le substrat

3 - Origine géographique et durée du maintien en culture

C) FACTEURS CONCERNANT L'ENVIRONNEMENT

1 - Climat

2 - Nature du substrat

III. CONCLUSION

En infection naturelle dans les cultures d'oeillets, le *Phialophora cinerescens* provoque des manifestations pathologiques décrites par divers auteurs (WICKENS, 1935; MOREAU, 1957, 1958; HELLMERS, 1958; PESANTE, 1958; BONIFACIO, 1960; NILSSON, 1964; ANDREUCCI, 1966).

Elles consistent essentiellement en un jaunissement et un flétrissement progressif des feuilles situées sur une même génératrice de la tige en liaison avec une gommose des vaisseaux du secteur caulinaire correspondant. Leur évolution n'est pas toujours facile à suivre dans les cultures et bien des facteurs mis en jeu échappent à tout contrôle. Seule l'infection expérimentale permet d'étudier avec précision le processus pathologique. Il nous a semblé indispensable de rechercher une expression numérique de la gravité des altérations foliaires. En effet, si l'état d'évolution de ces symptômes externes traduit l'extension du parasite dans l'hôte et l'importance des symptômes internes, cet indice foliaire permettra, sans détruire la plante, de suivre les étapes de l'invasion et, éventuellement, d'apprécier l'influence de divers facteurs sur l'évolution de la maladie.

I. SYMPTOMES SELON LE MODE D'INFECTION AU NIVEAU DES RACINES

A) INFECTION DU TYPE Ir

Au pied de chaque oeillet, le substrat est simplement arrosé avec une suspension contenant 30.10^6 spores de *P. cinerescens* par ml. L'infection est donc réalisée sans provoquer de blessures, dans les conditions les plus proches de celles d'une infection naturelle. Les symptômes ont été observés en différentes saisons, sur plusieurs variétés cultivées dans divers substrats: perlite, mais aussi vermiculite ou terreau qui avaient été utilisés dans des essais préliminaires; ils apparaissent après une incubation de 2 à 4 mois en général.

1 - Symptômes externes (fig. 9)

C'est avec beaucoup de discrétion que les premiers symptômes externes se manifestent; ils sont très subtils à déceler et, sans aucun doute, passeraient inaperçus au champ : une seule feuille est concernée; elle perd de sa turgescence, a donc tendance à se dérouler et peut présenter une petite tache amphigène rose violacé. Cette coloration, considérée comme caractéristique de la verticilliose par certains auteurs (HELLMERS, 1958; FLETCHER et GANNEY, 1966) peut cependant ne pas se produire chez quelques variétés d'oeillet (elle n'apparaît pas chez les cv. à fleur jaune tandis qu'elle est intense dans les cv. à fleur grenat ou violet) ou dans certaines conditions d'environnement : les feuilles, alors, montrent seulement des zones décolorées, jaunâtres. Puis ces manifestations s'aggravent, la feuille jaunit et se nécrose. En raison de la localisation vasculaire du parasite, les symptômes,progressant vers le haut de la plante, montrent une disposition superposée,souvent d'un seul côté de la tige qui peut elle-même rougir et se crevasser longitudinalement (fig. 11). Souvent le sommet de l'oeillet se fane et se déssèche brutalement avant que les taches foliaires aient pu s'y développer.

Bien que les plantes soient infectées par les racines, les premiers symptômes se manifestent non sur les feuilles les plus basses comme on pourrait s'y attendre, mais sur celles du 6e au 11e noeud le plus souvent (MOREAU, PERESSE et MOREAU C., 1969); de plus, les bourgeons axillaires reprennent leur développement à l'aisselle des feuilles basales qui gardent longtemps un aspect sain, alors que la partie supérieure de la plante se dessèche. Rien d'analogue ne nous semble avoir été signalé pour d'autres maladies vasculaires mais, en général, les plantes étudiées sont multipliées par semis de graines tandis que nos oeillets sont issus de boutures. Nous essaierons, dans le chapitre suivant, de trouver une explication à ce phénomène.

Les critères que nous avons retenus pour l'évaluation chiffrée des symptômes (PERESSE et MOREAU, 1968) sont voisins de ceux proposés par MATTA et DIMOND (1963) pour la fusariose de la tomate : on attribue à chaque feuille un indice I d'altération foliaire de 0 à 4 suivant l'importance de la surface altérée :

Fig. 9 : Oeillet "Coronation" infecté depuis 3 mois et présentant les symptômes de la verticilliose (infection sur oeillet âgé de 2 mois, selon le mode Ir). On remarque notamment :

- les feuilles de base d'aspect sain;
- la perte de turgescence des feuilles atteintes,
- la localisation unilatérale et la superposition des symptômes foliaires;
- la courbure apicale de l'oeillet du côté de l'attaque parasitaire.

Fig. 10 : Courbure apicale de la tige feuillée d'un oeillet attaqué unilatéralement par le *P. cinerescens*.

Fig. 11 : Tige d'oeillet crevassée du côté où le *P. cinerescens* se développe dans le xylème.

été appréciée sur coupes transversales effectuées au milieu des entre-noeuds : sur ces coupes, le plan ligneux de l'oeillet se divise nettement en 4 secteurs et on accorde à chacun d'eux un indice (G) de 0 à 4 suivant l'importance des gommes qu'il contient; l'indice de gommose oscille donc, pour une coupe, de 0 à 16. La gommose est généralement faible dans les parties hautes d'un plant; son évolution y perd toute signification car les vaisseaux, obstrués plus bas, ne peuvent plus assurer la montée de sève. On définit donc l'entre-noeud présentant le maximum de gommose. Jusqu'à hauteur de celui-ci, à partir du collet, les indices de gommose sont relevés dans les n entre-noeuds successifs; on les totalise et on calcule quel pourcentage du xylème est affecté dans cette partie de la tige (taux de gommose, Tg).

$$Tg = \frac{\sum_{i=1}^{n} Gi}{n \times 16} \times 100$$

La gommose dans les racines reste longtemps très discrète et n'y prend une réelle extension que pendant la phase terminale de la maladie.

3 - Corrélation entre symptômes foliaires et vasculaires

a) Comparaison entre indice d'altération foliaire et indice de gommose dans chaque oeillet

Nos observations ont porté sur une centaine de plants : un exemple est schématisé figure 12.

Les premiers symptômes foliaires apparaissent à une certaine hauteur (rarement au-dessous du 6e noeud), les feuilles de la base restant vertes. Parallèlement, les premiers entre-noeuds présentent une faible gommose généralement limitée jusqu'au 3e noeud à quelques vaisseaux dispersés dans le xylème secondaire. Plus haut, elle gagne les cellules voisines des vaisseaux malades et, progressivement, occupe le xylème dans toute son épaisseur sinon sur tout son pourtour. La gommose est maximale vers le 10e ou le 11e entre-noeud puis décroît. C'est juste au-dessus du niveau le plus chargé de gommes que se situent les symptômes foliaires les plus marqués.

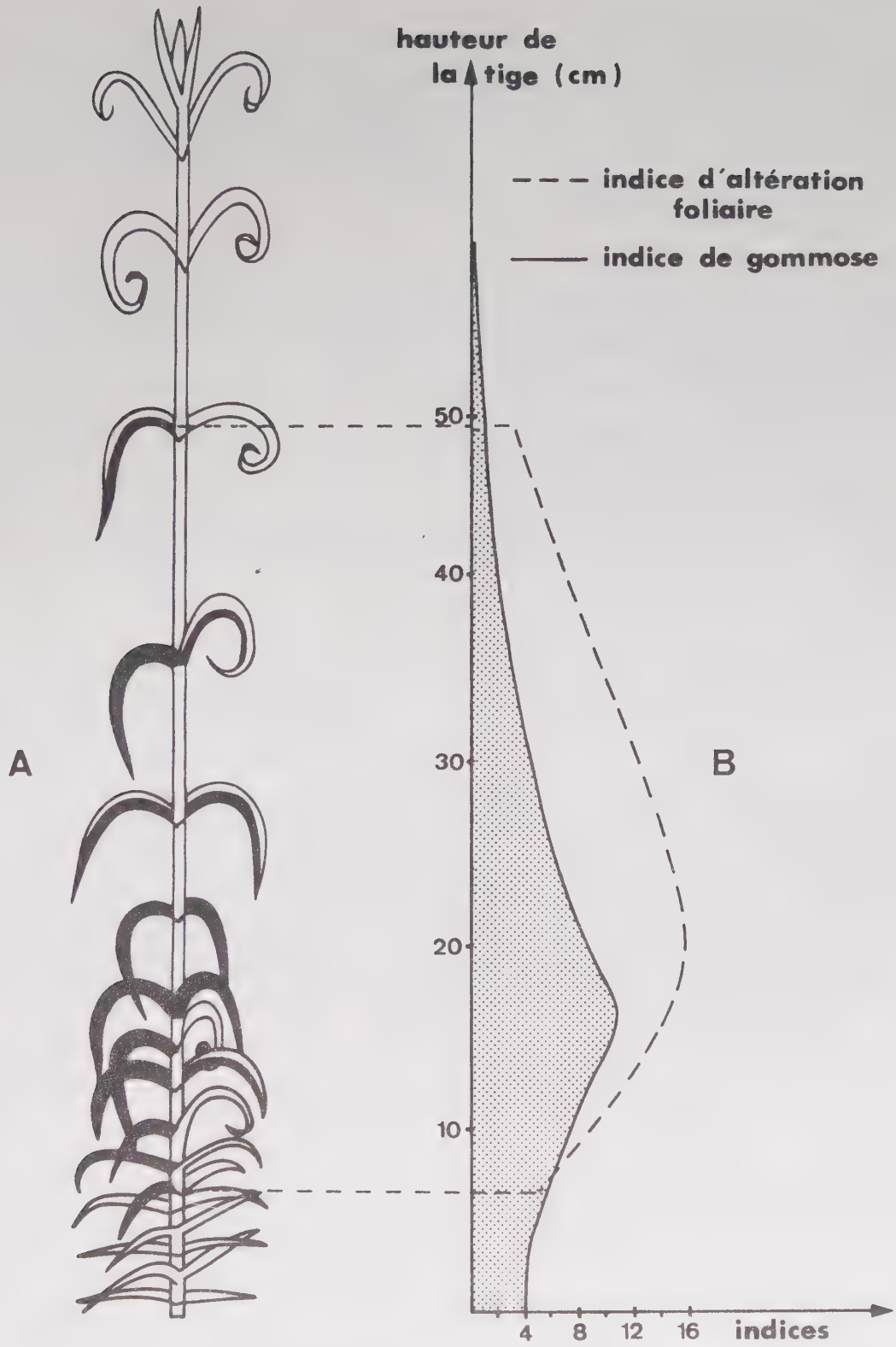


Fig. 12 : Corrélation entre symptômes foliaires et vasculaires

A : Disposition des taches foliaires (en noir) sur un oeillet "Coronation" infecté depuis 4 mois et demi.

B : Indices d'altération foliaire et de gommose dans le même oeillet.

En raison de la disposition phyllotaxique de l'oeillet (feuilles opposées décussées) et de la répartition des symptômes sur les feuilles superposées, souvent d'un seul côté de la tige, nous avons dû, pour normaliser la courbe, totaliser les indices d'altération des quatre feuilles de 2 noeuds successifs.

L'apparition des taches foliaires se montre donc tout à fait dépendante du développement de la gommose dans le xylème de la tige au-dessous des feuilles concernées et l'importance de ces symptômes externes reflète la gravité des symptômes internes.

b) Comparaison entre taux d'altération foliaire et taux de gommose des plants au cours de l'évolution de la maladie

Parmi les nombreux contrôles effectués, nous avons extrait quelques exemples jalonnant les étapes de la progression des symptômes pathologiques. Les chiffres sont présentés au tableau 1, par ordre croissant de gravité.

Tableau 1 : Comparaison entre taux d'altération foliaire (Tf) et taux de gommose (Tg) à différents stades d'évolution de la maladie (exemples pris dans un lot d'oeillets "Lolita" infectés par le *P. cinerescens* depuis 4 mois et présentant, du n° 1 au n° 6, des symptômes de gravité croissante).

Oeillets infectés	n° 1	n° 2	n° 3	n° 4	n° 5	n° 6
Tf	10,9	25,8	39	51,4	62,5	100
Tg	26,2	29,4	43,7	50,6	52	67,9

Quand les gommes sont peu abondantes (moins de 20 %), les symptômes foliaires peuvent être très faibles ou même nuls si les vaisseaux atteints ne pénètrent pas dans les feuilles. Au contraire, quand le taux de gommose dépasse 50 %, les vaisseaux restés fonctionnels sont insuffisants pour assurer la montée de sève à toute la partie supérieure de l'oeillet où les feuilles se flétrissent désormais brutalement. Quand la gommose atteint 60 à 70 %, le plant meurt.

A l'exclusion des valeurs extrêmes, la correspondance entre les taux d'altération foliaire et de gommose montre tout l'intérêt des relevés réguliers des symptômes externes pour la connaissance de l'évolution pathologique dans cette phase de la maladie.

L'expression chiffrée des symptômes facilite la comparaison entre plusieurs lots d'oeillets et permet éventuellement de discerner le rôle de divers facteurs sur l'évolution de la verticilliose. Notons toutefois que, pour apprécier un degré de sensibilité, des relevés tardifs perdent toute signification puisque, au bout d'un délai suffisamment long, le taux d'altération foliaire atteint 100 % pour toutes les plantes.

B) AUTRES MODES D'INFECTION PAR LES RACINES (MOREAU et PERESSE, 1969)

1 - Conditions expérimentales

Trois lots de 11 oeillets "Coronation" âgés de 2 mois sont infectés en avril selon l'un des procédés Ir, Irb_1, Irb_2. Ils diffèrent, rappelons-le, en ce que l'infection s'accompagne ou non de blessures des racines : dans le premier cas (Ir), le simple arrosage du sol avec la suspension de spores n'en provoque pas; dans le mode Irb_1, de nombreuses radicelles sont rompues au dépotage qui précède l'immersion du système racinaire dans la suspension infectieuse et dans le mode Irb_2, les blessures sont encore plus graves puisque, après dépotage, on sectionne 2 ou 3 grosses racines avant l'inoculation.

Parallèlement à chacun de ces trois lots infectés, est cultivé un lot témoin pour lequel la suspension de spores est remplacée par de l'eau. L'essai est réalisé en serre.

2 - Résultats

Quel que soit le mode d'infection, les symptômes ont même aspect et même localisation, mais leur délai d'apparition et la rapidité de leur évolution varient.

a) Durée d'incubation

Alors que les symptômes foliaires ne commencent à apparaître qu'après 7 semaines dans le lot Ir, la durée d'incubation n'est que de 5 à 6 semaines pour le lot Irb_1 et de 4 à 5 pour le lot Irb_2.

b) Modification de la taille des oeillets

Si, pour la taille des plantes, le dépotage et la section de racines n'ont apparemment qu'une faible importance en fin d'expérience (fig. 14, B), il n'en est pas de même lorsque ces opérations précèdent l'apport de l'inoculum (fig. 14, A). Outre une réduction de taille, les lots Irb_1 et Irb_2 ont présenté une courbure apicale (du côté où l'attaque du parasite est la plus forte) et leur floraison n'a pu être normale (fig. 13).

c) Evolution des symptômes

Assez lente pour le lot Ir, elle est accélérée pour les lots Irb_1 et Irb_2 dont presque tous les plants sont desséchés respectivement en 13 et 11 semaines.

3 - Conclusion

Les blessures des racines et leur trempage dans la suspension infectieuse ne modifient pas l'aspect des symptômes mais abrègent la phase d'incubation, ralentissent la croissance des plantes, entraînent une aggravation des symptômes et une évolution accélérée de la maladie; ces phénomènes sont d'autant plus marqués que les blessures sont plus importantes (MOREAU et PERESSE, 1969). Le fait est confirmé par GARIBALDI (1969) dans ses essais sur l'influence du mode d'inoculation des oeillets par le *P. cinerescens*. Or, au cours de la vie d'une plante, des blessures se produisent inévitablement (BURSTROM, 1965) sous l'action de nombreux facteurs : insectes, nématodes, rétractions du compost, façons culturales etc... et

Fig. 13 : Oeillets "Coronation" infectés depuis 2 mois par le *P. cinerescens* selon les modes :

Ir (A)

Irb_1 (B)

Irb_2 (C)

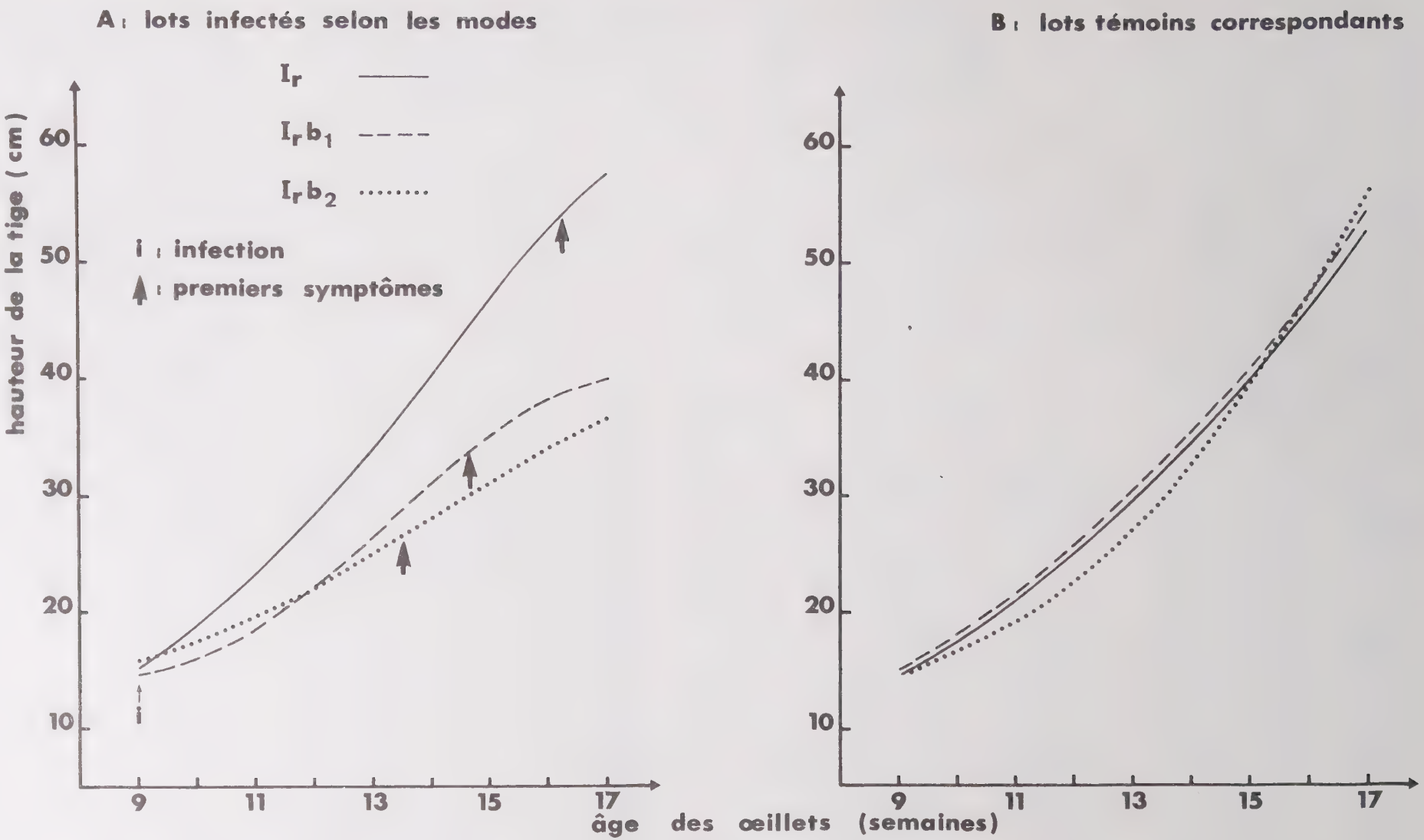


Fig. 14 : Influence du mode d'infection (avec ou sans blessures provoquées des racines) sur la taille moyenne de lots d'oeillets "Coronation".

GARIBALDI (1967) souligne, en effet, le rôle néfaste d'un sarclage profond qui entraîne une aggravation de la verticilliose.

On peut se demander si ces blessures permettent au *P. cinerescens* un accès plus rapide aux vaisseaux de l'hôte, une pénétration plus massive ou bien si elles influent sur l'état physiologique de l'oeillet en affaiblissant sa résistance. Ces hypothèses seront discutées plus loin (p. 78) à la lumière d'autres résultats.

II. FACTEURS MODIFIANT L'EVOLUTION DES SYMPTOMES

L'apparition et la sévérité d'une attaque parasitaire dépendent à la fois du pouvoir infectieux de l'inoculum et de la réceptivité de l'hôte. Ces facteurs sont liés aux potentialités génétiques des deux protagonistes mais peuvent aussi être influencés par les conditions d'environnement (DIMOND et HORSFALL, 1960; GARRETT, 1960).

A) FACTEURS CONCERNANT LA PLANTE

1 - Sensibilité variétale

L'infection simultanée (Ir) de lots de 31 oeillets "Lolita" et "Coronation" de même âge et maintenus dans les mêmes conditions, met en évidence une sensibilité différente de ces deux cultivars à la verticilliose (PERESSE et MOREAU, 1968). Les chiffres du tableau 2 montrent que l'évolution des symptômes externes est toujours plus rapide pour le cv. "Coronation" qui semble donc plus sensible que le "Lolita", bien que tous deux soient des sports du "William Sim".

A la suite de ces observations, la sensibilité d'un certain nombre de cultivars d'oeillets dont nous disposions (américains ou hybrides niçois) a été examinée par EL MAHJOUB en 1971. Les résultats sont résumés au tableau 3.

Tableau 2 : Comparaison des taux d'altération foliaire de 2 cultivars d'oeillets infectés simultanément (moyenne pour les 31 plantes de chaque lot)

1er essai : infection en décembre d'oeillets âgés de 2 mois 1/2 contrôle 6 mois plus tard

2ème essai : infection en février d'oeillets âgés de 4 mois 1/2 contrôle 4 mois plus tard

Cultivars	" Lolita "	"Coronation "
1er essai	57,9 %	90,4 %
2e essai	45,1 %	71,9 %

Tableau 3 : Comportement de divers cultivars d'oeillets après infection expérimentale par le *P. cinerescens* (chiffres relevés 3 mois 1/2 après l'infection).

Cultivars		Taille moyenne (en % de la taille des témoins)	Taux d'altération foliaire moyen
Hybrides niçois	"Fanny"	63,3	21,7
	"41"	65	26,5
	"Calendal"	86,9	31,4
Américains	"Lolita"	76,7	36,2
	"Jacqueline" (rouge)	46,2	28,9
	"Jacqueline" (orange strié de rouge)	70,8	57,3
	"Jacqueline" (jaune strié de rouge)	86,2	34,5

Tous les cultivars sont atteints de verticilliose mais ils y sont inégalement sensibles; ils présentent donc des altérations foliaires et une réduction de taille d'importance variable. Il est remarquable qu'un cultivar et les mutants qui en sont issus par irradiation des méristèmes apicaux (les "Jacqueline") aient des comportements différents vis-à-vis du même parasite. On constate, d'autre part, que les hybrides niçois "Calendal", "Fanny", "41", bien qu'accusant une nette réduction de taille, présentent des symptômes foliaires plus faibles que ceux de la plupart des oeillets américains.

Ces résultats rejoignent ceux obtenus par d'autres auteurs ; GARIBALDI (1966) compare 30 variétés d'oeillets couramment cultivées en Italie; tous les cv. américains se sont révélés très sensibles à la verticilliose tandis que, parmi les cv. méditerranéens (21), il en cite trois ("Gunda", "Roméo", "Corallo") moyennement résistants et un ("Lux") très résistant. MOREAU (1957) fait remarquer que la sensibilité des variétés à la verticilliose semble d'autant plus grande que l'intensité de lignification du xylème est moins forte; mais l'étude d'un grand nombre de cas serait nécessaire pour confirmation et les bases de ce comportement différent des variétés restent à établir. En tous cas, aucun cv. de *Dianthus caryophyllus* totalement résistant à cette maladie ne semble avoir été détecté et cela ne donne guère de possibilités à l'hybrideur et au sélectionneur pour l'obtention d'oeillets améliorés dans leur résistance à ce grave parasite.

2 - Age des oeillets au moment de l'infection (MOREAU et PERESSE, 1969)

Un lot homogène de 60 oeillets "Coronation" est placé au microphytotron et soumis, pendant toute la durée de l'essai, aux conditions suivantes : jour : 10 h, 10 000 lux, 18° C - nuit : 14 h, 12° C - hygrométrie : 70 à 90 %. 5 de ces plants servent de témoins (lot réduit faute de place suffisante dans l'enceinte conditionnée). Les autres forment 5 rangées de 11 oeillets qui seront infectés successivement à 3 semaines d'intervalle, selon le mode Ir. Les plantes sont respectivement âgées de 9, 12, 15, 18 et 21 semaines au moment de l'apport de l'inoculum.

a) Délai d'apparition des premiers symptômes

L'apparition des premiers symptômes foliaires s'échelonne sur quelques semaines, mais les durées moyennes de l'incubation pour les rangées infectées successivement présentent des différences significatives et mettent en évidence l'influence de l'âge de la plante au moment de l'infection sur la durée d'incubation (tableau 4).

Tableau 4 : Durée de l'incubation selon l'âge des oeillets au moment de l'infection.

Rangées	Age des oeillets à l'infection (semaines)	Durée moyenne de la période d'incubation (jours)	Intervalle de confiance* (jours)
A	9	71	64 - 77
B	12	72	62 - 83
C	15	52	43 - 62
D	18	56	50 - 62
E	21	65	57 - 73

* limites de l'intervalle de confiance au risque d'erreur de 5 % (calculé selon le test t de STUDENT).

Les périodes d'incubation les plus courtes (celles des rangées C et D) correspondent à la phase de croissance très active qui précède la floraison; les plus longues correspondent au stade de jeunesse de la plante et à l'épanouissement du bouton floral (fig. 15). Selon son stade de développement, l'oeillet semble donc plus ou moins réceptif pour le *P. cinerescens*.

Quelle que soit la durée d'incubation, la localisation des premières taches foliaires n'est pas modifiée : elles apparaissent toujours à une certaine hauteur sur la plante (entre le 6e et le 11e entre-noeud).

b) Modification de la taille des oeillets

Le tableau 5 rapporte la taille moyenne des lots d'oeillets quand ils sont âgés de 18 et 21 semaines : dans les conditions expérimentales présentes, elle est d'autant plus réduite que l'infection est précoce. Dans la rangée A, notamment, les entre-noeuds sont moins nombreux et plus courts; les plantes n'ont pas fleuri et se sont rapidement desséchées après l'apparition des symptômes externes.

En outre, les oeillets précocement infectés peuvent présenter une courbure apicale qui précède immédiatement ou apparaît en même temps que les premières taches foliaires (tous les oeillets de la rangée A, quelques-uns de la rangée B). Ce syndrome ne se manifeste que si l'action du parasite s'exerce sur l'apex avant ou au début de la phase de croissance accélérée de la plante.

Tableau 5 : Comparaison des tailles moyennes des lots d'oeillets infectés, en fonction de leur date d'inoculation.

Rangées	Plants âgés de 18 semaines		Plants âgés de 21 semaines	
	Temps écoulé depuis l'infection (semaines)	Taille (cm)	Temps écoulé depuis l'infection (semaines)	Taille (cm)
A	9	40,3	12	42,1
B	6	54,8	9	66,5
C	3	53,3	6	66,4
D	0*	63,6	3	76,7
E	0	65,6	0*	76,8

* jour de l'infection pour ce lot

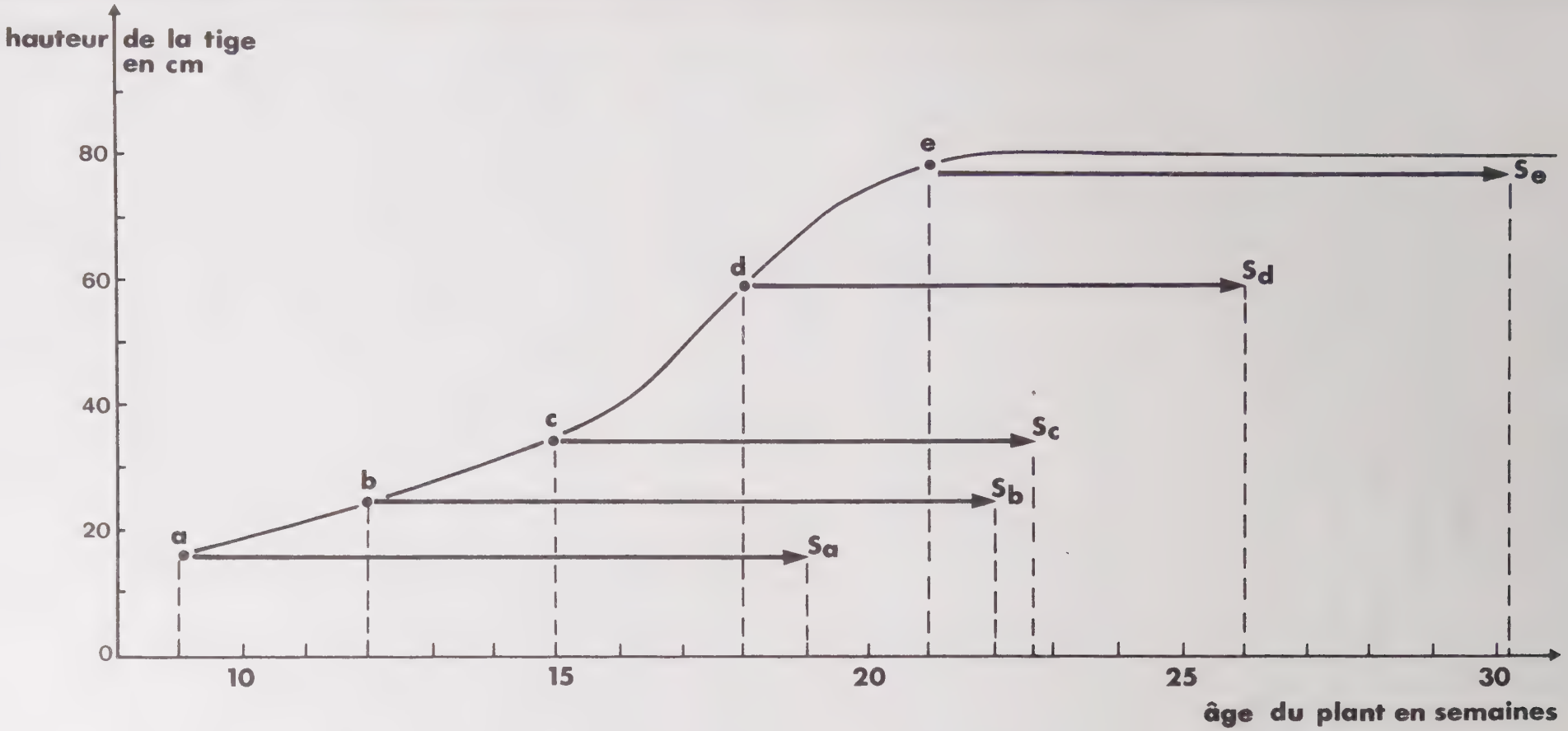


Fig. 15 : Durée de l'incubation en fonction de l'âge de l'oeillet au moment de l'infection.

La courbe représente la taille moyenne, au cours de l'essai, des oeillets témoins, non infectés.

La durée de l'incubation est symbolisée par les flèches horizontales.

a, b ... e : infection des rangées A, B ... E

s_a, s_b ... s_e : apparition des symptômes foliaires correspondants.

c) Conclusion

Les conditions d'environnement restant constantes pendant toute sa durée, cet essai met en évidence l'influence sur l'évolution pathologique de l'âge ou plus exactement du stade de développement de la plante-hôte. C'est au cours de la phase de croissance rapide qui précède sa floraison que les symptômes se manifestent le plus vite et que l'oeillet paraît le plus réceptif.

Dans le cas de la maladie hollandaise de l'orme, POMERLEAU (1965) précise que, dans les conditions climatiques du Québec, les arbres sont particulièrement sensibles à l'infection par le *Ceratocystis ulmi* (Buis.) C. Moreau quand celle-ci a lieu entre le 15 mai et la fin de juin, c'est-à-dire quand les jeunes pousses s'allongent vigoureusement. C'est justement pendant cette période que la vitesse d'ascension du champignon dans la tige est maximale, activité ascensionnelle qui s'amorce quand se sont formés, du sommet vers la base, les gros vaisseaux de printemps (POMERLEAU, 1966) où la sève circule activement.

Pour la verticilliose de l'abricotier, VIGOUROUX *et al.* (1969) constatent une corrélation frappante entre l'intensité de végétation des arbres et le développement du parasite, les symptômes s'amplifiant à la fin du printemps; une guérison apparente ou définitive peut même intervenir lors du ralentissement de la végétation.

Pour d'autres trachéomycoses, une corrélation entre l'aggravation des symptômes et un stade physiologique particulier de l'hôte a également été soulignée : après la formation des boutons floraux du tabac (WRIGHT, 1969), après une période de jours courts permettant la mise à fleur chez le chrysanthème (BUSCH et SCHOOLEY, 1970) et la tubérisation chez la pomme de terre (BUSCH et EDGINGTON, 1967), lorsque ces plantes sont atteintes de verticilliose.

L'évolution de ces maladies vasculaires semble donc être en rapport, soit avec la structure et l'activité conductrice du xylème, soit avec le métabolisme de l'hôte qui en fait, à un moment donné, un terrain plus favorable au développement du parasite.

B) FACTEURS CONCERNANT LE PARASITE

1 - Densité de l'inoculum (PERESSE, 1973)

GARRETT (1956) définit le potentiel d'inoculum en ces termes : "the energy of growth of a parasite available for infection of a host at the surface of the host organ to be infected". Dans cette notion, la densité correspond à un facteur intensité pour un inoculum dont l'aptitude à infecter dépend, par ailleurs, de conditions qui lui sont internes et externes.

Dans nos essais, pour tenter d'apprécier l'importance de ce facteur sur l'évolution de la maladie, nous avons utilisé des oeillets "Scania" âgés de 3 à 4 mois, cultivés en serre. Réparties en plusieurs lots, ces plantes sont simultanément infectées selon le mode Ir avec des suspensions de spores de densités croissantes. Pour chaque condition, nous avons :

- noté la durée d'incubation;
- recherché par mise en culture à partir de coupes sériées, la présence du parasite dans la tige;
- chiffré l'évolution des symptômes.

a) 1er essai

Auprès d'un lot témoin, six groupes de 15 oeillets sont infectés en janvier avec des suspensions contenant de 10^2 à 10^7 spores par ml (ces chiffres sont utilisés ci-dessous pour désigner les différents lots).

Bien que, à peu près simultanément dans les lots 10^7, 10^6, 10^5, quelques plantes présentent les premiers symptômes foliaires, la durée moyenne de l'incubation dans chacun de ces lots est d'autant plus longue que la densité de l'inoculum est plus faible (56, 72 et plus de 80 jours respectivement)

A la fin de l'essai (6 mois après l'apport de l'inoculum), les autres lots ne présentaient pas encore de symptômes mais, sous serre, les conditions de température deviennent défavorables à l'expression de la maladie dès la fin du mois d'avril. Nous avons toutefois voulu vérifier, dans le cas du lot 10^4, la présence éventuelle du *P. cinerescens* dans les plantes :

nous l'avons trouvé régulièrement dans les tiges jusqu'à une quinzaine de centimètres de hauteur.

La taille des oeillets a été mesurée toutes les deux semaines (tableau 6). 60 jours après l'inoculation, la taille moyenne des lots qui présentent des symptômes est réduite par rapport aux témoins. Bien que les différences relevées soient assez faibles (en raison du stade de développement alors atteint par les oeillets), le calcul de l'écart-type permet de les considérer comme significatives. Ce phénomène commence à se manifester conjointement à l'apparition des taches foliaires.

On constate aussi que les symptômes foliaires évoluent plus rapidement avec les densités d'inoculum les plus élevées, mais ils n'ont pas été chiffrés dans cet essai.

Afin de préciser ces résultats, notamment en ce qui concerne la présence du *Phialophora* dans la tige pendant l'incubation et la progression des symptômes externes , un second essai a été mis en place.

b) 2ème essai

Quatre lots de 30 oeillets sont infectés en janvier avec des suspensions contenant 10^3, 10^5, 10^7, 10^9 spores de *P. cinerescens* par ml. Toutes les 2 semaines à partir de l'infection, pour 2 ou 3 plantes dans chaque lot, des fragments sériés de tige (prélevés de 0 à 20 cm de hauteur) sont déposés sur milieu de culture. Nous y avons mis le *Phialophora* en évidence dans les proportions inscrites au tableau 7 : il est présent dans la tige de tous ou d'une partie des oeillets des lots 10^9, 10^7, 10^5, 15 jours après l'infection et on l'y retrouve dès le 25e jour dans le lot 10^3. Pour toutes les densités d'inoculum utilisées ici, le parasite a donc pénétré rapidement jusque dans la base des tiges de la plupart des plantes; mais son extension y est d'autant plus lente que la densité de l'inoculum présent dans le sol est plus faible.

Dans cet essai, les symptômes foliaires se sont manifestés dans tous les lots mais, comme dans l'essai précédent, après une incubation d'autant plus longue, en moyenne, que la densité de l'inoculum est plus faible : elle est de 52, 58, 85 et plus de 106 jours pour les lots 10^9, 10^7, 10^5 et 10^3 respectivement.

Tableau 6 : Taille moyenne des lots d'oeillets infectés selon le mode Ir avec des suspensions de spores de densités croissantes.

Jours après l'infection	Témoins		10^2		10^3		10^4		10^5		10^6		10^7	
	Taille moyenne (cm)	Ecart type	Taille moyenne (cm)	Ecart type	Taille moyenne (cm)	Ecart type	Taille moyenne (cm)	Ecart type	Taille moyenne (cm)	Ecart type	Taille moyenne (cm)	Ecart type	Taille moyenne (cm)	Ecart type
0	31,4	2,4	31,4	1,4	32	2,3	31,9	1,8	31,6	2,3	31,2	2,3	31,1	2,5
17	38,6	5,1	41,6	6,2	42	6,5	44	6,6	41,6	8,4	39,8	5,6	38,3	4,4
32	52,1	7,9	56,1	6,8	57,9	7,4	56	7,5	53,9	7,1	54,9	7	51,9	5,8
45	69	5,8	70,2	5,2	70,1	4,9	70,5	8,2	68,2	4,8	66	6,4	66,1	6,1
60	77,6	3,5	80	3,4	79,1	1,6	78,4	4	73,9	2,3	74	3,8	73	3,4

Tableau 7 : Localisation du *P. cinerescens* dans la tige des oeillets au cours de l'incubation, après infection (Ir) avec des suspensions de spores de densités croissantes.

Jours après l'infection	Densité de l'inoculum (spores/ml)			
	10^9	10^7	10^5	10^3
15	2[1] /2[2] 6-6 cm[3]	3/3 7-9-3 cm	1/2 6 cm	0/2
25	2/2 15-6 cm	3/3 10-12-14 cm	2/2 14-4 cm	1/2 1 cm
39	S	3/3 20-20-20 cm S	2/2 15-19 cm	1/3 8 cm
53	S	S	2/2 S 20-20 cm	2/2 10-12 cm
67	S	S	S	2/3 20-20 cm
89	S	S	S	S

(1) Nombre de plants où le *P. cinerescens* est retrouvé dans la tige.

(2) Nombre de plants étudiés.

(3) Hauteur maximale atteinte par le parasite dans la tige de chacun de ces plants.

S Symptômes foliaires apparus.

A partir de l'apparition des symptômes externes, le taux d'altération foliaire est relevé chaque semaine (fig. 16) : on constate, que, dans chaque lot, les symptômes s'aggravent régulièrement, plus rapidement pour ceux qui ont reçu les suspensions de spores les plus concentrées; à tout moment, leur sévérité est donc d'autant plus grande que la densité de l'inoculum apporté dans le sol est plus forte.

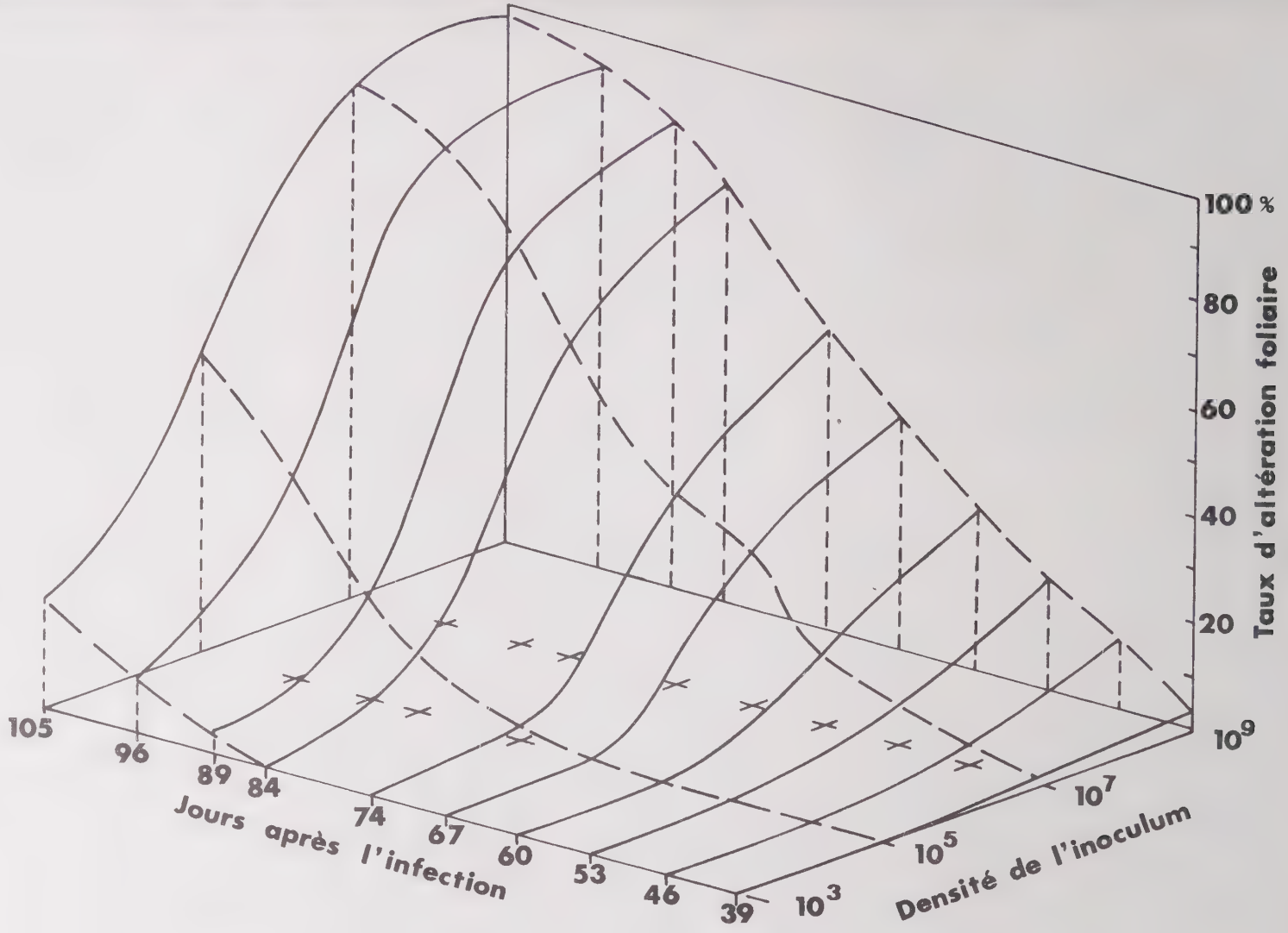


Fig. 16 : Gravité des symptômes foliaires en fonction de la densité de l'inoculum dans le sol et du temps après l'infection.

c) Conclusion

Dans les essais précédents, comme la densité des propagules dans le sol est le seul élément qui différencie entre eux les lots d'oeillets, nous pouvons conclure que la verticilliose a une incubation d'autant plus longue et une évolution d'autant plus lente que la densité de l'inoculum est plus faible, ce qui coïncide avec les observations de GARIBALDI (1969). Ainsi que le rappelle POWELSON (1970), les conclusions de LACY et HORNER (1965) pour la verticilliose de la menthe vont dans le même sens et TOLMSOFF (1959) rapporte des résultats analogues pour la verticilliose de la pomme de terre puisqu'il constate que les symptômes apparaissent plus précocement, sont plus graves et entraînent la mort des plantes plus rapidement quand la densité des "propagules" (conidies et microsclérotes) du *Verticillium dahliae* augmente dans le sol.

Pour toutes les densités d'inoculum utilisées, le *P. cinerescens* a pu pénétrer assez rapidement jusque dans la basse tige des oeillets mais, pour les densités les plus faibles (les plus proches sans doute de celles qu'on rencontre dans les sols naturellement infectés), son développement y est lent et l'oeillet peut l'héberger pendant des mois sans présenter de symptômes. TOLMSOFF et POWELSON (1964) signalent également qu'aux faibles densités d'inoculum, l'infection systémique de la pomme de terre par le *V. dahliae* a lieu sans que se manifestent les symptômes caractéristiques de la maladie. L'accroissement de la densité de l'inoculum augmente les chances de pénétration et il semble que l'effet additif ou synergique d'infections multiples permette au *P. cinerescens* de rompre plus aisément l'équilibre hôte-parasite en sa faveur.

2 - Persistance de l'inoculum dans le substrat

En 1964, NILSSON montre que le *P. cinerescens* est capable de survivre plus de deux ans dans des échantillons de sol desséchés; mais, dans un sol maintenu humide et en l'absence d'oeillet, le nombre de propagules de ce champignon diminue rapidement (on ne l'isole plus au bout de 5 mois à 17° C). Il considère donc qu'il est peu apte à la compétition avec les microorganismes du sol.

Dans nos conditions expérimentales, nous avons aussi essayé de préciser les possibilités de survie du *P. cinerescens* dans le substrat utilisé (MOREAU et PERESSE, 1969) : 10 pots contenant un jeune oeillet planté en perlite et 10 autres contenant de la perlite seulement, reçoivent chacun environ 2.10^9 spores de *P. cinerescens* mises en suspension dans l'eau. Ils sont maintenus en serre tempérée et arrosés de la même façon. Toutes les trois semaines, le parasite est recherché dans un échantillon de perlite prélevé à 2 cm de profondeur dans un pot de chaque série, par une technique de dilution. Nous avons réisolé le *Phialophora* du substrat pendant les six mois qui ont suivi l'infection (l'expérience n'a pas été poursuivie au-delà). Malgré une différence entre la flore des pots avec ou sans oeillet, le *P. cinerescens* a persisté de la même façon dans les deux séries et au bout de ce laps de temps, chaque pot contenait encore de 22.10^4 à 15.10^5 propagules.

Une infection massive du substrat, telle que nous la pratiquons habituellement doit assurer l'attaque immédiate de l'oeillet. Comme, malgré l'absence de formes de résistance chez ce champignon, un pourcentage non négligeable de spores semble capable de persister plusieurs mois dans la perlite, des pénétrations plus tardives et successives doivent pouvoir se produire, au hasard des mouvements d'eau entraînant des spores, du développement du champignon ou de la croissance des racines.

En ce qui concerne le maintien de ce parasite dans un sol ayant porté une culture d'oeillets infectés, nous pensons que ses chances d'y subsister sont d'autant plus grandes qu'il est le plus souvent hébergé dans des débris de plantes restés dans la terre après l'arrachage, bien protégé au sein du xylème très lignifié et imprégné de gommes.

3 - Origine géographique et durée du maintien en culture

Nous avons comparé le pouvoir pathogène vis-à-vis de l'oeillet de divers isolats de *Phialophora cinerescens*, d'origine géographique variée, certains provenant d'isolements récents, d'autres conservés en mycothèque sur milieu de malt ou de Czapek, à 10° C, depuis plusieurs années (près de 20 ans pour le plus ancien).

Deux essais ont été effectués, les plantes étant infectées par les racines dans le 1er, au niveau de la tige dans le 2ème.

a) Infection par les racines (Ir) (MOREAU et PERESSE, 1969)

Six lots de 5 oeillets "Coronation" âgés de 18 semaines et placés en microphytotron sont infectés avec des isolats différents de *P. cinerescens*, selon le mode Ir. Quatorze semaines plus tard, les symptômes foliaires ont été chiffrés; les résultats sont groupés au tableau 8.

Tableau 8 : Infection (Ir) d'oeillets "Coronation" avec différentes souches de *P. cinerescens* (résultats relevés 14 semaines après l'apport de l'inoculum).

Isolats	Origine géographique	Durée du maintien en culture (ans)	Nombre de spores par pot	Nombre de plants avec symptômes	Taux d'altération foliaire moyen
N 52	Côte d'Azur	15	9.10^7	5/5	14,5
B	Bretagne	12	20.10^7	5/5	4,1
AN	Allemagne du Nord	11	30.10^7	3/5	10,6
I 62	Italie du Nord	6	30.10^7	2/5	0,7
N 62	Côte d'Azur	6	35.10^7	5/5	37,7
N 66	Côte d'Azur	2	35.10^7	4/5	10,7

b) Infection par injection de spores dans la tige (Iti) (MOREAU, PERESSE et EL MAHJOUB, 1971)

Dix isolats ont été utilisés dans cet essai. Tous ont été obtenus à partir d'oeillets montrant des symptômes de verticilliose, sauf la souche I 62 qui a été isolée en août 1962 à partir d'oeillets italiens présentant seulement une légère chlorose (les symptômes de la maladie sont peu apparents en été).

Des oeillets "Coronation" âgés de 8 mois et fleuris sont répartis en 10 lots de 5 plants chacun. A 8 cm environ au-dessus du sol, on injecte, dans la tige, 2 gouttes de la suspension de spores (Iti). Dans les semaines suivantes, l'apparition des symptômes est notée pour chaque plant et, à la fin de l'essai, le taux de gommose est évalué à 5 cm au-dessus du point d'inoculation (Tableau 9).

Tableau 9 : Infection d'oeillets "Coronation" avec différentes souches de *P. cinerescens* par injection de spores dans la tige (Iti).

Isolats	Origine des isolats	Durée du maintien en culture (ans)	Délai moyen d'incubation (jours)	Taux de gommose moyen (%)
N 52	Nice	19	23,4	65,4
N 53	Nice	18	21,2	53,4
N 62	Nice	9	23,4	55,5
N 66	Nice	5	23,6	52,2
N 68	Nice	3	20,6	66,8
N 69	Nice	2	25,2	52,8
I 60	Italie du Nord	11	21,2	62,9
I 62	Italie du Nord	9	28,8	26,8
B	Bretagne	15	25,8	40,2
AN	Allemagne du Nord	14	27,8	32,8

L'introduction massive et directe du *P. cinerescens* dans les vaisseaux de la tige des oeillets permet un meilleur contrôle de la quantité d'inoculum introduit dans la plante, entraîne l'apparition rapide de symptômes foliaires alors que, après introduction du parasite dans le sol, l'infection naturelle par voie racinaire nécessite une incubation qui dure de 2 à 4 mois. Cette technique n'est cependant pas sans critique : elle élimine le rôle que peut jouer le système racinaire au début de la pathogénèse et ne nous renseigne que sur celui de la tige. Cependant, cette méthode a pu être retenue pour tester la résistance de variétés de coton au *Verticillium albo-atrum* (BUGBEE et PRESLEY, 1967).

c) Conclusion

- Conservation du pouvoir pathogène : pour tous les isolats de *P. cinerescens*, l'infection par les racines ou l'inoculation dans la tige entraîne l'apparition des symptômes foliaires caractéristiques de la maladie. Quelle que soit leur origine et la durée de leur maintien sur milieu gélosé (jusqu'à 19 ans), toutes ces souches ont donc conservé un pouvoir pathogène certain.

- Virulence : tous les isolats ne montrent pas la même virulence . Ainsi dans le 2e essai, une durée moyenne d'incubation plus brève (de 20 a 21,2 j) et une gommose du xylème plus accentuée (de 53 à 66 %) semblent désigner les isolats N 53, N 68 et I 60 comme plus virulents que les autres. Par contre pour I 62, B et AN, les mêmes critères (durée moyenne d'incubation de 22,8 à 27,8 j et indices de gommose de 26 à 40 %) indiquent une virulence plus faible. Dans le 1er essai, bien qu'il ait été réalisé 3 ans auparavant, l'infection par les mêmes souches (I 62, B, AN) cause aussi les symptômes les moins graves. Les résultats sont donc concordants, que le système racinaire intervienne ou non dans l'infection de l'oeillet.

La virulence d'un isolat n'est pas en rapport avec la durée de son maintien sur milieu gélosé. Ainsi, dans le 1er essai, la souche I 62 se montre la moins virulente mais ce n'est pas celle qui a été isolée le plus anciennement; et, dans le 2e essai, la souche N 51 maintenue en culture depuis très longtemps (19 ans) est parmi celles qui ont montré le pouvoir pathogène le plus marqué. Après une culture prolongée, sur milieu synthétique essentiellement, le *P. cinerescens* reste donc capable d'attaquer gravement un hôte avec lequel il n'a eu pendant ce temps aucun contact.

- Origine : tous les isolats d'origine méditerranéenne sont les plus virulents, exception faite de I 62; mais celui-ci est issu d'oeillets ne présentant pas de symptômes typiques et fut isolé en été après plusieurs mois de forte chaleur; la température élevée, peu favorable au parasite, a peut-être permis la sélection de certains types nucléaires présentant, entre autres, les caractères d'une virulence atténuée. Les isolats provenant de Bretagne et d'Allemagne du Nord semblent moins virulents, mais le nombre insuffisant de ceux que nous avons testés ne permet pas de conclusion définitive.

C) FACTEURS CONCERNANT L'ENVIRONNEMENT

1 - Climat

Au mois de novembre, après rempotage d'oeillets "Coronation", 15 d'entre eux sont placés en serre tempérée dans des conditions proches de celles des hivers doux de la région méditerranéenne : température de 12 à

15° C, jours courts, humidité de 70 à 95 %. Les autres (11) sont maintenus en microphytotron où les conditions rappellent plutôt celles du début de printemps sous le même climat : température de 18° C le jour sous une intensité lumineuse de l'ordre de 10 000 lux pendant 10 h, de 12° C la nuit, humidité de 70 à 90 %.

Tous ces oeillets sont infectés de la même façon (Ir) par le *P. cinerescens*, à l'âge de 9 semaines. La durée moyenne de l'incubation fut de 105 jours sous serre et de 71 jours seulement au microphytotron.

Les dianthiculteurs connaissent bien les fluctuations de la verticilliose au cours des saisons : dans les cultures en pleine terre de la région méditerranéenne notamment, elle est peu manifeste en hiver, présente le plus d'acuité au printemps et en automne avec un ralentissement en été. De nombreux auteurs (WHITE, 1936; MOREAU, 1957; GARIBALDI, 1968) soulignent que l'évolution de la maladie est liée à la température ambiante : rapide si la température est comprise entre 15 et 22° C, elle est lente au-dessous de 15° C et les températures supérieures à 25° C lui sont particulièrement défavorables.

On sait que, *in vitro*, le *P. cinerescens* se développe mal à 25°C et au delà, et il est probable que sa croissance dans la plante soit également compromise quand il fait chaud. Il y persiste cependant et a été isolé en plein été de tiges d'oeillets ne présentant pas de symptômes (MOREAU, 1963) Dans le cas de la verticilliose du coton, un accroissement de la résistance de l'hôte entre 23 et 30° C semble dû non seulement à un ralentissement de la croissance du champignon mais, en même temps, à une activation du métabolisme de défense de l'hôte puisque la synthèse de phytoalexines est considérablement accrue à ces températures (BELL et PRESLEY, 1969). On peut se demander si un mécanisme analogue intervient chez l'oeillet.

Au dessous de 15° C, l'évolution de la maladie est très ralentie mais l'explication par action directe de la température sur le développement du parasite est encore moins satisfaisante ici car, *in vitro*, c'est aux environs de 11° C que sa croissance linéaire et sa sporulation sont optimales. La température influence aussi l'oeillet : au-dessous de 15° C son développement est nettement plus lent et son métabolisme, dans ces conditions, en fait probablement un substrat moins favorable pour le parasite. Au printemps

au contraire, l'élévation de température favorise la reprise de végétation d'autant plus qu'elle s'accompagne de l'allongement des jours et c'est à ce moment que l'oeillet est le plus sensible au *P. cinerescens*.

2 - Nature du substrat

GARIBALDI (1967) ne constate aucune différence significative dans les résultats d'infections expérimentales par le *P. cinerescens*, d'oeillets plantés dans divers substrats se distinguant entre eux par leur granulométrie, leur teneur en calcaire et en matière organique.

Par contre, NILSSON (1964) met en évidence l'influence de la nutrition azotée sur l'évolution de la verticilliose de l'oeillet : il fournit aux plantes une solution nutritive plus ou moins riche en azote (0,01 - 0,065 ou 0,15 g/litre) apporté sous forme de nitrates de potassium et de calcium : celles qui reçoivent le plus d'azote se développent rapidement, sont plus grandes et plus vigoureuses; ce sont elles aussi qui manifestent des symptômes les premières et ils sont plus graves. Dans ce cas, on constate donc une fois de plus que la sensibilité maximale de l'oeillet au *P. cinerescens* coïncide avec sa croissance végétative la plus rapide. De même, pour la verticilliose du fraisier, WILHELM (1955) note que les plants luxuriants développés dans un sol riche en azote sont plus affectés par la maladie, ce qui concorde avec les résultats de ROBERTS (1944) pour la tomate, de KEYWORTH et HEWITT (1948) pour le houblon, et de RANNEY (1962) pour le coton.

EL MAHJOUB (1971) remarque que les oeillets cultivés en vermiculite deviennent plus sensibles à la verticilliose que ceux qui sont maintenus en perlite. On sait qu'à partir de ces deux substrats se produisent des échanges d'ions avec la solution nutritive : la perlite retient du potassium et du magnésium mais libère du calcium dont les plantes pourront disposer. Or BECKMAN (1969, 1971) souligne l'importance des liaisons Ca pour la stabilité des parois cellulaires. EDGINGTON *et al.* (1961) constatent qu'un abaissement de la teneur en calcium du substrat entraîne une sensibilité accrue de la tomate à la fusariose; ces auteurs attribuent le phénomène à ce que, dans les plantes déficientes en calcium, les parois cellulaires pauvres en polypectates de calcium sont dégradées plus facilement par les enzymes pectinolytiques du champignon.

La vermiculite retient du calcium mais libère du potassium et surtout du magnésium. Les plantes risquent d'y ressentir une déficience en calcium, mais cet élément est en partie remplacé par du magnésium (COIC *et al.* (1969) l'ont montré pour des plants de tabac cultivés en vermiculite). Or celui-ci confère aux parois une stabilité analogue. Dans ce cas, il est donc possible que l'équilibre ionique dans la plante agisse par une autre voie pour modifier la sensibilité de l'oeillet au *P. cinerescens*.

III. CONCLUSION

L'infection expérimentale des oeillets telle que nous l'avons pratiquée, nous a permis d'observer avec précision les symptômes de la verticilliose et de suivre leur évolution. Celle-ci ne s'effectue pas toujours avec la même vitesse car les relations hôte-parasite sont soumises à un ensemble complexe de facteurs dont il est parfois difficile de séparer les rôles et dont nous avons tenté d'évaluer l'importance; l'expression chiffrée des symptômes foliaires nous a facilité cette appréciation.

Parmi ces facteurs, les uns dépendent directement du génotype de l'hôte ou du parasite :

- les variétés d'oeillets sont sensibles à des degrés divers au *P. cinerescens*, mais aucune ne semble totalement résistante, ce qui ne permet guère d'envisager l'obtention, par combinaisons génétiques, de variétés immunes.

- les souches de *P. cinerescens* sont plus ou moins virulentes mais on n'en connait aucune de non pathogène pour l'oeillet. En outre, elles conservent ce pouvoir pathogène de façon stable, même en culture prolongée sur milieu synthétique.

D'autres facteurs influencent le comportement des deux protagonistes et modifient le déroulement de la pathogénèse en favorisant ou en défavorisant davantage l'un ou l'autre. Certains d'entre eux ont des effets convergents.

- l'oeillet est particulièrement réceptif quand sa croissance végétative est vigoureuse et rapide. Tous les facteurs qui favorisent le développement de la plante (âge, amélioration de la nutrition azotée, des conditions de température et d'éclairement par exemple) causent une apparition plus rapide

et une aggravation des symptômes de la maladie. Pour expliquer ce phénomène, on peut avancer quelques hypothèses : au cours de la croissance rapide des jeunes pousses, il se forme dans le xylème de gros vaisseaux où la sève circule activement, ce qui pourrait favoriser le développement du parasite et permettre l'ascension rapide de ses spores à distance. Pour une même plante, la composition de la sève varie de façon saisonnière et selon son état physiologique (HUGUET et SAVE, 1969; FREDON et BONNEMAIN, 1973); son métabolisme actif fait peut-être de la plante un substrat plus riche pour le champignon, à moins que ses potentialités de résistance ne se trouvent amoindries à ce moment.

- Les facteurs susceptibles de favoriser la pénétration du *P. cinerescens* dans l'oeillet et de multiplier les points d'infection comme les blessures des racines ou l'augmentation de la densité de l'inoculum dans le sol provoquent aussi une aggravation de la maladie et son évolution accélérée. L'oeillet ne se comporte pas comme un substrat inerte pour le *Phialophora*, il oppose à sa progression dans les tissus une certaine résistance qu'un faible inoculum ne surmonte que très lentement et difficilement; par contre, la pénétration d'un inoculum important produit un effet de masse qui lui permet d'envahir rapidement la plante.

Cependant, la verticilliose de l'oeillet n'est jamais une affection à évolution rapide et, même dans les conditions les plus favorables, l'apparition des premiers symptômes exige encore un délai d'incubation de plusieurs semaines. Nous nous sommes efforcée de saisir comment, au cours de cette période "silencieuse" de l'incubation, le parasite accède aux vaisseaux du xylème et y progresse.

CHAPITRE III

INSTALLATION DU PHIALOPHORA CINERESCENS DANS L'ŒILLET

S O M M A I R E

I. ACCES DU *P. CINERESCENS* AUX VAISSEAUX DE L'OEILLET

A) DELAIS

B) MODES D'ACCES

1 - Evolution du cal cicatriciel au talon de la bouture

2 - Pénétration de spores du *P. cinerescens* par des blessures des racines

3 - Pénétration à travers les tissus corticaux des racines

II. PROGRESSION DU *P. CINERESCENS* DANS L'OEILLET

A) AU COURS DE L'INCUBATION

B) APRES L'APPARITION DES SYMPTOMES EXTERNES

III. DISCUSSION ET CONCLUSION

Lorsque hôte et parasite se trouvent en présence, pour que s'établisse la relation parasitaire, le champignon doit d'abord pénétrer dans le système vasculaire de la plante puis être capable de s'y développer et de l'envahir progressivement.

I. ACCES DU *P. CINERESCENS* AUX VAISSEAUX DE L'OEILLET

A) DELAIS

Quelles que soient les modalités de nos infections expérimentales par les racines, les symptômes foliaires n'apparaissent chez l'oeillet qu'après une longue incubation de un à plusieurs mois. On pourrait en trouver l'explication dans la lenteur de développement du *P. cinerescens*, sa progression depuis son point de pénétration dans le système racinaire jusqu'aux vaisseaux de la tige exigeant vraisemblablement un important délai. Nous avons donc tenté de préciser au bout de combien de temps le parasite était susceptible d'atteindre le xylème de la tige (PERESSE, 1968).

Après infection expérimentale par les racines, sans blessures provoquées (Ir), le parasite est recherché dans la partie basale de la tige par mise en culture à partir de coupes sériées. Trois essais successifs ont été réalisés, avec des oeillets "Coronation", les premiers contrôles ayant lieu de plus en plus précocement après l'infection, c'est-à-dire après 15 jours dans le 1er essai, 8 jours dans le 2e et 2 jours dans le 3e : ils se sont chaque fois révélés positifs pour la plupart des plantes testées. La possibilité pour le *P. cinerescens* d'atteindre les vaisseaux de la tige en moins de 48 heures a été maintes fois confirmée au cours d'essais ultérieurs.

Conclusion : contrairement à notre attente, l'accès du parasite aux vaisseaux de la tige est très rapide puisqu'il s'y trouve déjà 48 h après

l'infection. Dans des délais aussi brefs et, *a fortiori*, pour un champignon dont le développement est lent, la pénétration n'a pu s'opérer par un processus biologique impliquant la germination des spores, puis la traversée des tissus corticaux des racines par les hyphes mycéliennes et leur croissance dans le xylème. Il nous faut supposer que des spores ont dû accéder directement, c'est-à-dire par des blessures naturelles, dans les vaisseaux où, entraînées par le courant de sève, elles ont été véhiculées à distance.

D'ailleurs, dans les jours qui suivent l'infection, le *Phialophora* est souvent retrouvé dans la tige de façon discontinue ce qui est un indice en faveur de sa présence sous forme de spores et non d'un mycélium développé.

B) MODE D'ACCES

Quand on met une bouture d'oeillet à enraciner, sa base est enfouie dans un substrat humide et un cal cicatriciel s'y développe; nous avons envisagé l'éventualité d'une cicatrisation insuffisante de la section basale qui autoriserait la pénétration des spores au moment où la suspension infectieuse est apportée dans le sol. D'autre part, nous savons que des blessures du système racinaire se produisent fréquemment au cours de la vie d'une plante (BURSTROM, 1965) pour des causes variées : nous avons donc étudié les conséquences de la rupture de racines volontairement provoquée au moment de l'infection. Enfin, nous avons examiné l'aptitude du mycélium du *P. cinerescens* à traverser les tissus de racines intactes pour atteindre le xylème.

1 - Evolution du cal cicatriciel au talon de la bouture (PERESSE, 1971)

La structure et le développement du cal cicatriciel sont étudiés sur des boutures âgées de 2, 9 et 18 semaines.

a) Cal de 2 semaines (fig. 17, A)

Le cal commence à se développer aux dépens des tissus parenchymateux corticaux et du cambium; des ébauches de racines y sont visibles. Quelques éléments de transfusion se constituent dans la moelle dont les

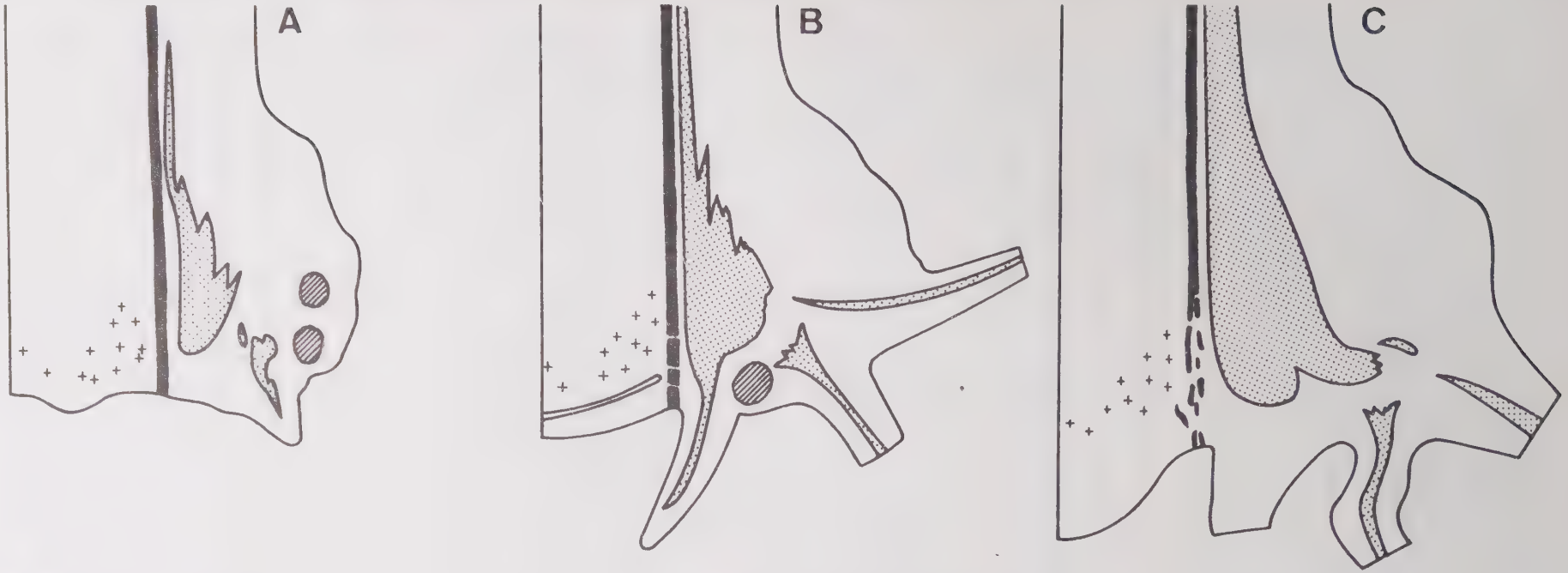


Fig . 17 DEVELOPPEMENT DU CAL CICATRICIEL AU TALON D'UNE BOUTURE D'ŒILLET.
(coupes longitudinales)

A : cal de 2 semaines - B : cal de 9 semaines - C : cal de 18 semaines

cellules superficielles se subérifient; de nouveaux vaisseaux de type réticulé naissent de l'activité cambiale à la base de la tige. Les vaisseaux primaires coupés au prélèvement de la bouture sur le pied-mère sont encore ouverts sur la section mais ils s'emplissent de gommes brunâtres de façon d'ailleurs irrégulière et discontinue.

b) Cal de 9 semaines (fig. 17, B)

Le cal a augmenté de volume et un cambium de cicatrisation a fonctionné dans la zone médullaire. La jeune plante possède alors de nombreuses racines longues de plusieurs centimètres dont les vaisseaux se prolongent dans le xylème secondaire de la tige édifié depuis le bouturage. Bien qu'aucune formation ne vienne recouvrir l'orifice des vaisseaux primaires, ceux-ci, plus ou moins comprimés et fragmentés par le développement des racines voisines, sont obstrués de gommes cicatricielles et, autour des tronçons les plus bruns, un suber de cicatrisation tend à les isoler du reste des tissus.

c) Cal de 18 semaines (fig. 17, C)

Le xylème secondaire s'est épaissi au niveau du cal et se développe peu à peu en hauteur dans la jeune plante. A la base, on retrouve à grand peine les vaisseaux primaires car ils sont écrasés, morcelés, déplacés, par le développement des tissus néoformés.

d) Conclusion

Les bouleversements anatomiques au niveau du cal, notamment dans les vaisseaux primaires sectionnés à la cueillette de la bouture, ne permettent manifestement plus une pénétration profonde des spores par cette voie lors d'infections expérimentales pratiquées sur des oeillets âgés de plus de 2 mois comme c'est toujours le cas dans nos essais sur oeillets en pots. Cette possibilité ne serait cependant pas exclue pour les jours qui suivent la mise à enraciner si le sol était infecté à ce moment.

Remarque

Après infection selon le mode habituel (Ir) d'oeillets issus de la germination de graines (Vilmorin, "Triomphe") et âgés de 5 mois et demi, le *P. cinerescens* est retrouvé tout aussi précocement à la base des tiges. Dans de telles plantes non bouturées donc dépourvues de cal, l'insuffisance de la cicatrisation ne peut être mise en jeu et les spores n'ont pu pénétrer que par les blessures qui affectent couramment le système racinaire des végétaux.

2 - Pénétration de spores du *P. cinerescens* par des blessures des racines

a) Pénétration et transport, par le courant vasculaire, de spores de *P. cinerescens* à partir de la section d'une racine

Pour chaque plant utilisé, une racine est dégagée de la perlite et infectée selon le mode Irb_3. Puis le champignon y est recherché par mise en culture à partir de fragments sériés.

Les résultats groupés au tableau 10 montrent que les spores pénètrent dans les vaisseaux du xylème ouverts sur la section et y sont véhiculées passivement par le courant vasculaire sur une distance d'ailleurs assez variable.

Par des blessures de racines qui se produisent fréquemment au cours de la vie d'une plante, la pénétration directe de spores de *P. cinerescens* dans les vaisseaux du xylème est donc possible. Elle aura d'autant plus de chance de se réaliser que les blessures seront plus nombreuses et que le nombre de conidies dispersées dans le sol sera plus élevé. Ces spores peuvent être transportées par le courant de sève, sur une certaine distance et elles atteindront d'autant plus facilement la tige qu'elles auront pénétré par des blessures plus proches du collet.

Tableau 10 : Progression des spores du *P. cinerescens* entraînées par le courant vasculaire dans le xylème de l'oeillet à partir de la section d'une racine.

Age des oeillets	Distance de la section au talon de la tige (cm)	Progression des spores (cm)
10 mois	11 12 10 11	6,5 8,5 10 4
18 mois	21 27 16 19 20 13	16 5 8 11 4 6

b) Influence de blessures des racines sur l'évolution de la maladie

Dans le chapitre précédent, nous avons évoqué leurs conséquences graves sur l'évolution des symptômes externes. En outre, l'extension du parasite dans le xylème est révélée par le brunissement des zones infectées. Dans dix plants de chacun des lots infectés respectivement selon les modes Ir, Irb_1 et Irb_2, l'indice de gommose a été évalué dans les 4e, 5e et 6e entre-noeuds, neuf semaines après l'infection. Les moyennes des chiffres obtenus sont inscrites au tableau 11.

Tableau 11 : Indice de gommose dans la tige d'oeillets "Coronation", 9 semaines après infection avec ou sans blessures des racines (à un niveau donné, l'indice de gommose maximum est noté 16)

Entre-noeud	Ir	Irb_1	Irb_2
4e	2,2	6,7	10
5e	2,9	8,8	11,7
6e	3	9,4	13,7

Dans le lot Ir, les coupes transversales de tiges montrent seulement quelques petites plages brunes et la gommose occupe moins de 1/5 du xylème. Par contre, dans les autres lots dont l'infection s'est accompagnée de blessures, les îlots gommeux sont multiples et occupent la plus grande partie du tissu ligneux.

Ces taches gommeuses matérialisent les foyers d'infection dispersés dans le xylème. Ils sont d'autant plus nombreux que le système racinaire a été plus traumatisé. Les blessures facilitent donc bien la pénétration du parasite, probablement par accès direct des spores dans les vaisseaux brisés.

Pour les plantes dont les racines ont été lésées au moment de l'infection, la durée d'incubation est abrégée, l'évolution de la maladie accélérée, la croissance altérée : cela ne se justifie pas par un accès plus rapide du parasite aux vaisseaux de la tige puisque, même après infection par simple arrosage avec une suspension de spores (Ir), nous l'y mettons en évidence au bout de 48 heures seulement; c'est l'importance de l'inoculum introduit dans la plante grâce aux multiples blessures des racines, sa dispersion en de nombreux secteurs du système vasculaire qui doivent être mises en cause.

c) Transport des conidies dans la partie basale de la tige d'oeillet

α - Spores ayant pénétré dans les plantes entières après infection par la technique habituelle (Ir)

Par dépôt de coupes sériées sur milieu de culture, nous avons pu préciser, pour des oeillets "Coronation" d'âge différent (de 2 à 5 mois) la hauteur maximale atteinte par le parasite dans la tige, 48 h après l'infection (Tableau 12).

Au bout de ce bref délai, le *P. cinerescens* est mis en évidence dans la tige de la plupart des plantes, ce qui confirme les résultats antérieurs mais il s'y trouve dans la partie basale seulement. Si on l'isole un peu plus haut dans les oeillets plus âgés, il n'y est malgré tout présent qu'au dessous du 6e noeud, l'accès aux entre-noeuds supérieurs lui semble barré.

Tableau 12 : Isolement du *P. cinerescens* de tiges d'oeillets d'âge différent 48 h après l'infection (Ir)

Age des oeillets	Hauteur des tiges feuillées (cm)	Hauteur maximum d'isolement du *P. cinerescens* dans chacun des plants testés (cm)
2 à 3 mois	14 à 20	0 - 0 - 0 - 0 - 1 - 2 - 2,5 - 3 - 3,5 moyenne : 1,3
4 mois	20 à 30	0 - 2 - 4 - 4 moyenne : 2,5
5 mois	50 à 60	4,5 - 5 - 6,5 - 6 - 8 moyenne : 6

β - Spores ayant pénétré par une section de la tige au ras du collet

Les tiges de 5 oeillets âgés de 3 mois, et de 5 autres âgés de 7 mois, sont coupées sous l'eau au ras du collet et leur section est plongée, pendant 24 h, dans une suspension contenant environ 8.10^5 conidies de *P. cinerescens* par ml (des essais préliminaires ont montré qu'un délai de trempage plus long dans la suspension ne favoriserait pas l'ascension des spores à un niveau plus élevé). Puis le parasite est recherché dans la tige par mise en culture de coupes sériées. Parallèlement, la longueur maximale des vaisseaux au-dessus de la section est déterminée pour des oeillets des mêmes lots (5 de chaque), par insufflation d'air (tableau 13).

Tableau 13 : Ascension passive des spores du *P. cinerescens* dans les vaisseaux d'oeillets d'âge différent, à partir d'une section de la tige au ras du collet.

Age des oeillets	Hauteur de la tige feuillée (cm)	Longueur maximale des vaisseaux au-dessus de la section (cm)	Hauteur maximale d'isolement du *P. cinerescens* (cm)
3 mois 1/2	25 à 30	8 à 11	5 à 7
7 mois	70 à 90	10 à 20	6 à 12

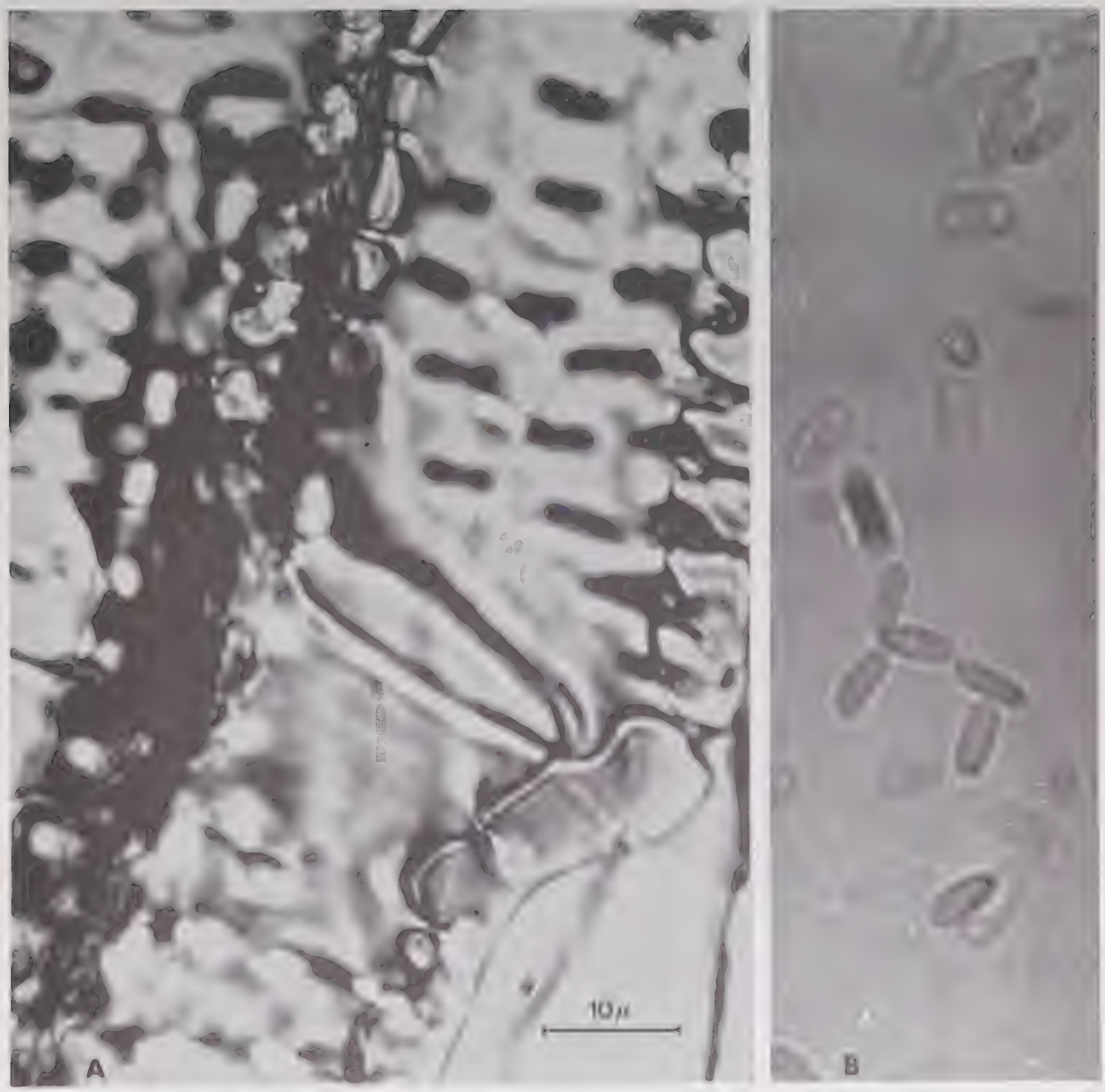


Fig. 18 : A - Perforation entre deux éléments de vaisseau du xylème d'oeillet.

B - Spores du *P. cinerescens* au même grossissement

Fig. 19 : Coupe longitudinale du xylème d'oeillet au voisinage d'une brèche foliaire.
Noter (flèches) quelques cloisons non perforées entre éléments de vaisseau.

Dans toutes les tiges, des spores sont entraînées en grand nombre dans le xylème mais, même dans ces conditions, sur une distance limitée seulement. La hauteur qu'elles atteignent est proportionnelle à la longueur maximale des vaisseaux dans la zone concernée, tout en lui restant inférieure de plusieurs centimètres; il est vrai que seuls quelques vaisseaux atteignent cette longueur, la plupart sont plus courts. Les spores ont donc peu de chances d'atteindre cette hauteur, d'autant plus qu'au cours de leur transport, elles risquent d'être arrêtées par le rebord des perforations entre deux éléments successifs ou par les irrégularités de leur paroi.

On peut donc admettre que, si les éléments conducteurs de la tige ont un diamètre suffisant et communiquent entre eux par des perforations assez larges pour autoriser le passage de spores comme celles du *P. cinerescens* (fig. 18), l'ascension passive de ces propagules par le courant transpiratoire est limitée par la longueur même des vaisseaux dont elles ne peuvent franchir la paroi terminale. De telles cloisons sont plus nombreuses à la base des noeuds où les vaisseaux s'écartent de part et d'autre des brèches foliaires grâce à la juxtaposition d'éléments courts aux extrémités en biseau et aux parois transversales incomplètement perforées et parfois même intactes (fig. 19), ce qui risque de favoriser le blocage des conidies à ce niveau.

Etudiant la pénétration de spores de *Stereum purpureum* dans les rameaux de prunier à partir de blessures de taille, GROSCLAUDE (1974) établit également une relation entre la profondeur qu'elles sont susceptibles d'atteindre dans le xylème et la longueur des vaisseaux de cette Rosacée.

d) Conclusion

Des spores du *P. cinerescens* sont susceptibles d'accéder directement au xylème de l'oeillet par des blessures des racines. Elles y sont entraînées par le courant transpiratoire et véhiculées passivement dans les limites autorisées par la longueur des vaisseaux. L'extrêmité de ces conduits peut se trouver à distance très variable de la blessure : certaines spores sont donc rapidement arrêtées; d'autres, au contraire, peuvent atteindre même le xylème secondaire de la tige si elles ne rencontrent pas

auparavant la paroi terminale du vaisseau où elles sont entraînées. Cet accès rapide à la partie basale de la tige est d'autant plus probable que la blessure est plus proche du collet mais ne concerne en général qu'un très petit nombre de spores. En outre, celles-ci sont arrêtées dans la tige dès les premiers centimètres car, inévitablement, elles se heurtent bientôt à l'extrêmité du vaisseau : cela empêche l'invasion immédiate de la plante jusqu'à son sommet. A partir de ces spores établies dans la basse tige, l'infection ne pourra se poursuivre que grâce à leur germination et au développement du mycélium parasite.

3 - Pénétration à travers les tissus corticaux des racines

L'accès direct du *P. cinerescens* à l'état de spores aux vaisseaux de l'oeillet par des blessures des racines et leur transport sur une certaine distance par le courant de sève explique sa présence dans la tige peu de temps après l'infection. Mais cela n'exclut pas la possibilité, pour les hyphes mycéliennes, de traverser les tissus corticaux et d'atteindre le xylème du cylindre central, processus certainement plus lent mais capable d'assurer également l'infection.

a) Comportement des spores de *P. cinerescens* au voisinage de racines d'oeillet

Le protocole expérimental est inspiré des travaux de PAYEN (1962, 1964) sur le comportement des champignons dans les sols : de la terre passée au tamis (ouverture de maille : 2 mm) est mise en pots de plastique, humidifiée et laissée au repos sous couvercle de verre, 3 semaines à la température du laboratoire (période de rééquilibration nécessaire car un sol brisé semble perdre son activité fongistatique).

Des graines d'oeillet "Enfant de Nice, rouge" et de tomate "Super Marmande" sont désinfectées à l'hypochlorite de Ca et mises à germer en boîtes de Pétri sur eau gélosée.

On réalise une suspension de spores de *P. cinerescens* (3.10^6 spores par ml) dans de l'eau gélosée (20 g/l d'agar) maintenue en surfusion

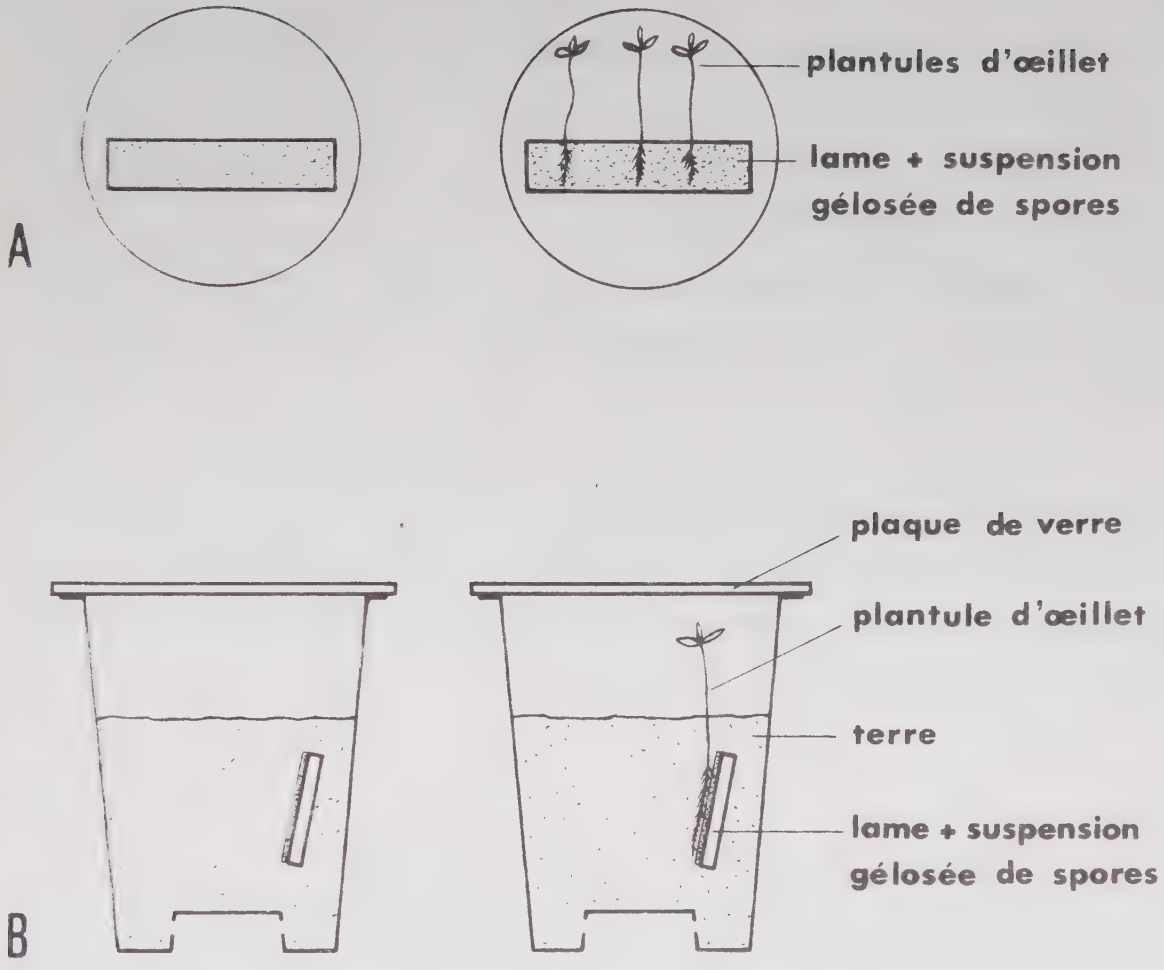


Fig. 20 DISPOSITIF EXPERIMENTAL POUR TESTER LE COMPORTEMENT DES SPORES DE P. CINERESCENS AU VOISINAGE DE RACINES D'ŒILLET.

A: EN CHAMBRE HUMIDE.
B: DANS LA TERRE.

à 47° C. Des lames de verre stériles sont enduites d'une pellicule de cette préparation et, après refroidissement, disposées de la façon suivante (fig. 20) :

- 10 lames sont placées en chambre humide, à la température du laboratoire. Sur 5 d'entre elles, on applique la radicule de jeunes oeillets.

- 5 lames sont enterrées dans les pots de terre en prenant soin de presser légèrement la terre contre elles.

- 10 lames sont enterrées de la même façon mais après avoir appliqué à leur surface, la radicule de quelques plantules d'oeillets (5 lames) ou de tomates (5 lames) âgées d'une semaine.

Au bout de 3 jours, toutes ces lames sont colorées au bleu coton et examinées au microscope. Le pourcentage de spores germées est calculé sur plusieurs centaines de spores par lame et ce comptage est effectué le long des radicules pour celles qui sont en contact avec oeillets (plante-hôte) ou tomates (espèce notoirement insensible à ce parasite). Les résultats sont inscrits au tableau 14.

Tableau 14 : Germination des spores du *P. cinerescens* dans différentes conditions, en présence ou non de racines d'oeillet ou de tomate.

Conditions expérimentales	Pourcentage de spores germées	
	1er essai	2ème essai
en chambre humide	5 %	1 %
en chambre humide, avec racine d'oeillet		85 %
dans la terre	33 %	7 %
dans la terre avec racine d'oeillet	88 %	85 %
dans la terre avec racine de tomate	35 %	

Dans l'eau gélosée, les spores du *P. cinerescens*, petites et dépourvues de réserves germent difficilement. Au bout de 3 jours, un petit nombre d'entre elles seulement est entré en germination, leur tube germinatif est court.

Au contact de la terre, elles sont susceptibles de subir, en plus, l'action de la fongistase, phénomène complexe contrôlé par un équilibre entre facteurs inhibiteurs et stimulateurs dans le sol (WATSON et FORD, 1972). Dans ce milieu hétérogène, là où les stimulateurs l'emportent (en présence de substances nutritives sous forme de débris végétaux, par exemple), la fongistase est levée et les spores peuvent germer au niveau de microhabitats. C'est probablement pourquoi, sur les lames enfouies dans la terre, la répartition des spores germées est irrégulière (il y a des "plages" où elles sont beaucoup plus nombreuses), leur pourcentage est plus élevé qu'en chambre humide et peut varier d'un essai à l'autre selon la composition de la terre utilisée.

Dans le sol, de même qu'en chambre humide, la proximité de jeunes racines d'oeillets déclenche la germination des spores du *P. cinerescens*, sans doute grâce à l'exsudation de substances qui diffusent autour d'elles, dans la rhizosphère. Cette action n'est sensible qu'à quelques millimètres de la racine, dans la zone des poils absorbants mais non au niveau de l'apex. En outre, les tubes germinatifs ne manifestent aucun chimiotactisme, ils ne semblent pas s'orienter spécialement vers la racine d'oeillet.

Le voisinage d'une racine de tomate n'augmente pas de façon significative le pourcentage de spores germées bien qu'elle émette aussi autour d'elle des produits d'exsudation. D'autres essais avec un grand nombre de plantes diverses seraient nécessaires pour apprécier s'il existe une spécificité d'action des exsudats de l'oeillet et peut-être d'autres espèces sensibles sur la germination des spores du *P. cinerescens*. En tout état de cause, les spores de ce parasite sont induites à germer au voisinage des radicelles de l'oeillet et cela est un facteur supplémentaire favorable à l'infection.

b) Pénétration du mycélium du *P. cinerescens* dans les jeunes racines d'oeillet

Cette pénétration a été étudiée sur des plantules d'oeillets "Chabaud Carmen" ou "Enfant de Nice, rouge", en culture axénique en tubes, sur milieu gélosé. Dans ces conditions, le *P. cinerescens* se trouve en présence d'un système racinaire intact.

Quand les jeunes oeillets sont âgés d'un mois, l'inoculum est déposé, à l'aide d'un fil ensemenceur, au voisinage de la racine principale, quelques centimètres au-dessous du collet. Trois à quatre semaines plus tard, des symptômes foliaires (flétrissement, jaunissement, nécrose) se manifestent sur les feuilles basales puis progressent vers le sommet de la plante qui finit par se dessécher complètement; au cours de ce processus, on peut isoler le parasite de la tige. C'est bien la preuve que le *P. cinerescens* est capable de pénétrer les tissus de son hôte sans aucune blessure.

Des coupes dans les plantes infectées permettent de l'observer *in situ*. Un abondant mycélium se développe autour des racines et, à son contact, les poils absorbants semblent perdre leur turgèscence et sont flétris. Les hyphes pénètrent dans les cellules pilifères, mais on en voit assez rarement à l'intérieur des poils absorbants qui ne semblent pas être, malgré leur grande surface, des points de pénétration privilégiés.

Les points d'émergence des racines latérales paraissent constituer des zones favorables à l'invasion : le mycélium est abondant dans le parenchyme et la gommose bien nette dans le xylème à ce niveau. REID (1958) pour la fusariose du melon et GARBER et HOUSTON (1966) pour la verticilliose du coton le remarquent également. A ce niveau, les tissus corticaux de la racine principale ont été traumatisés et rompus par le développement de l'ébauche racinaire qui prend naissance en profondeur dans le péricycle.

Les cellules pilifères tentent parfois de s'opposer à l'effraction par le champignon en effectuant sur leur face interne, au point de pénétration, un dépôt de substances pariétales qui forme une protubérance plus ou moins développée. Nous avons distingué deux types de protubérances dans l'assise pilifère :

- les unes sont hémisphériques et d'aspect zoné comme si elles étaient formées par dépôt de couches successives. On distingue autour d'elles une auréole de granulations dans le cytoplasme des cellules qui les élaborent. Elles ne se colorent pas sous l'action de la phloroglucine chlorhydrique, ne prennent pas le vert d'iode, mais sont nettement colorées en bleu par le chloroiodure de zinc et en rose par le rouge de ruthénium. Ces protubérances sont donc riches en cellulose et en substances pectiques mais semblent dépourvues de lignine.

- les autres, en forme de doigt de gant plus ou moins allongé, sont aussi d'aspect zoné et engainent un grêle filament mycélien logé dans un

Fig. 21 A : Pénétration du *P. cinerescens* dans les racines d'oeillet : développement de "lignitubers" dans les cellules endodermiques.

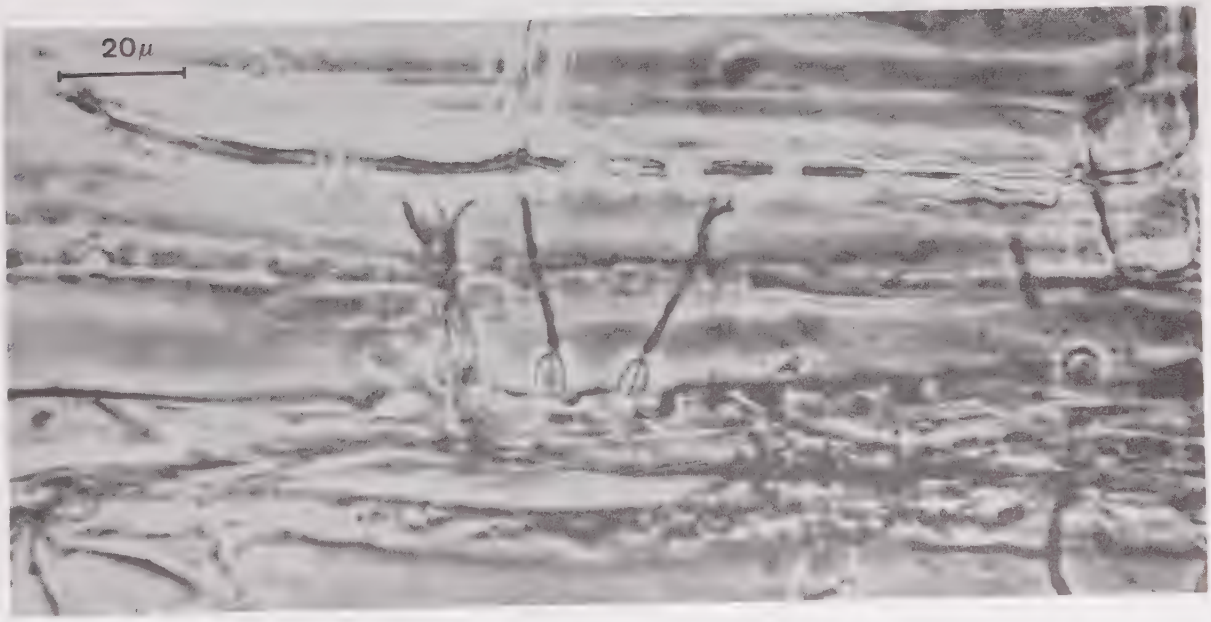


Fig. 21 B : Les hyphes du *P. cinerescens* ont percé l'extrémité des "lignitubers" et poursuivent leur développement.

Fig. 22 : Pénétration des hyphes du *P. cinerescens* dans les vaisseaux du xylème d'une radicelle d'oeillet.

canal central. Elles présentent les mêmes réactions colorées que les précédentes.

De telles formations ont été décrites depuis longtemps et sont actuellement connues chez de nombreuses plantes. En 1928, FELLOWS nomme "lignitubers" celles qu'il observe dans les racines de blé infectées par l'*Ophiobolus graminis* car elles sont imprégnées de lignine; mais, dans d'autres cas, elles sont constituées de cellulose ou de callose (AKAI, 1959).

Malgré la présence de ces épaississements pariétaux chez l'oeillet, le *Phialophora* arrive à pénétrer dans l'assise pilifère : il forme des pelotons mycéliens et sporule abondamment dans certaines cellules qui apparaissent bourrées de conidies.

Les hyphes traversent le parenchyme cortical selon un trajet intracellulaire, elles s'étranglent considérablement pour passer à travers les parois mais les protubérances sont très rares dans cette zone. Puis elles atteignent l'endoderme : cette assise cellulaire réagit vigoureusement à leur contact, édifiant une multitude de "lignitubers" parfois très longs (fig. 21, A). Ils sont en doigt de gant, d'aspect zoné, avec un canal central. La phloroglucine ne les colore pas en rose, mais ils sont verts après passage au carmin aluné-vert d'iode et roses avec le Soudan III. Ils semblent donc être de nature différente de ceux de l'assise pilifère et contenir de la subérine (notons que ces cellules endodermiques sont déjà orientées vers la synthèse de cette substance qui imprègne les bandes de Caspari). Mais dans bien des cas, les hyphes percent l'extrémité de ces protubérances (Fig. 21, B), reprennent leur croissance vers le cylindre central puis gagnent les vaisseaux du xylème (Fig. 22) où elles provoquent l'apparition de substances gommeuses qui colorent le bois en jaune-brun.

Les hyphes du *P. cinerescens* sont également capables de pénétrer à l'apex des racines; elles y provoquent d'importants épaississements pariétaux et bloquent le développement du méristème. Cette nécrose de l'apex est suivie par l'apparition d'une nouvelle ébauche racinaire juste en arrière du méristème terminal mais elle est rapidement infectée à son tour.

c) Pénétration du *P. cinerescens* dans les racines âgées

Pour quelques oeillets "Scania" âgés de 8 mois et cultivés en serre tempérée, une grosse racine est dégagée de la perlite. On applique à sa surface un fragment de culture du *P. cinerescens* sur milieu gélosé que l'on maintient en place à l'aide d'une feuille d'aluminium avant d'enfouir à nouveau la racine dans le substrat. Après 3 semaines de contact, le mycélium du champignon est recherché sur coupes transversales à ce niveau.

La racine est recouverte d'un suber constitué de plusieurs couches de cellules; les hyphes se développent à sa surface, pénètrent même dans les cellules des assises les plus externes mais ne peuvent traverser ce tissu protecteur.

Cependant, sous l'effet de la croissance en épaisseur, le suber se craquelle : le mycélium tapisse les anfractuosités au fond desquelles les cellules corticales vivantes ne sont protégées que par 1 ou 2 couches de cellules subérifiées.

Nous avons constaté qu'à la faveur de ces craquelures, les hyphes sont capables d'atteindre le parenchyme cortical (fig. 23). Des réactions de défense de la plante se développent alors : les parois des cellules s'épaississent et se subérifient, des "lignitubers" peuvent se former et autour de la zone concernée, de nombreuses redivisions participent à son isolement, voire son élimination. Nous n'avons jamais vu de telles attaques se développer jusqu'au cylindre central.

Malgré l'importance d'un inoculum virulent, placé en contact étroit avec la racine, la pénétration du *P. cinerescens* au niveau des parties âgées subérifiées semble sinon impossible, du moins très difficile et peu probable.

II. PROGRESSION DU *P. CINERESCENS* DANS L'OEILLET

Après avoir étudié les modes d'accès du parasite aux vaisseaux de son hôte, nous avons tenté d'y suivre son extension au cours des différentes étapes de la maladie, après infection au niveau des racines.

Fig. 23 : Tentative de pénétration du *P. cinerescens* dans une racine d'oeillet à la faveur d'une craquelure du suber.
Noter les épaississements pariétaux et les redivisions des cellules autour du point d'attaque.

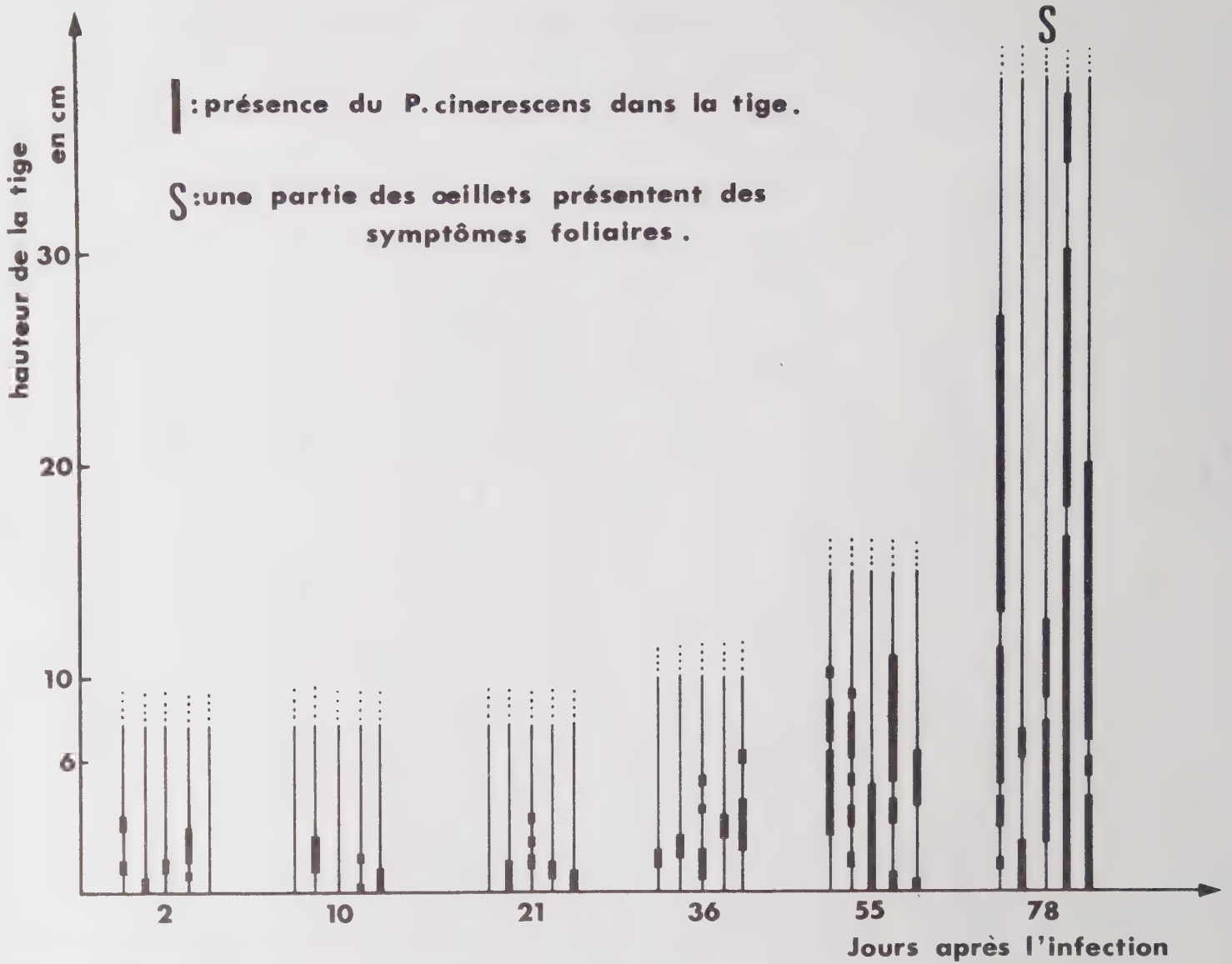


Fig. 24 - LOCALISATION DU P. CINERESCENS DANS LA TIGE AU COURS DE L'INCUBATION (oeillets "Coronation" infectés à 2 mois 1/2 selon le mode Ir).

La présence du parasite dans les tissus est établie par la technique des coupes sériées déposées sur milieu de culture. Les contrôles échelonnés après infection sont effectués, chaque fois, sur 3 à 5 oeillets, dans la tige essentiellement.

A) AU COURS DE L'INCUBATION (PERESSE, 1968)

Plusieurs essais ont été réalisés dans diverses conditions : infection avec ou sans blessure, sur oeillets "Lolita" ou "Coronation" âgés de 2 à 5 mois, soumis à des conditions climatiques différentes selon la date d'infection.

Les résultats de l'un d'eux sont représentés fig. 24 pour des oeillets "Coronation" âgés de 2 mois 1/2, cultivés en serre et infectés en avril selon le mode Ir.

L'accès rapide de spores aux vaisseaux de la tige est confirmé : en moins de 2 jours, le parasite est présent dans les premiers centimètres au-dessus du collet de la plupart des plants; sa répartition y est discontinue et ponctuelle, ce qui laisse supposer qu'un petit nombre de spores seulement a pu gagner la tige.

Dans les semaines suivantes, il ne semble pas prendre davantage d'extension. Bien que précocement installés dans la tige, ces "postes avancés" ne peuvent donc pas constituer, au moins immédiatement, des foyers infectieux actifs. Les spores trouvent peut-être à ce niveau des conditions peu favorables à leur développement : nous avons d'ailleurs noté (cf. chap. II) que , même à un stade d'évolution avancé de la maladie, l'indice de gommose y reste plus faible, ce qui reflète une extension limitée du parasite dans cette portion de la tige. D'autre part, les spores y sont probablement trop peu nombreuses pour réaliser un "effet de masse" qui, nous l'avons souligné (cf. chap. II) , semble nécessaire pour surmonter aisément la résistance de l'hôte.

C'est seulement plus d'un mois après l'infection qu'une légère extension du parasite se manifeste dans la tige. Il est difficile, à ce moment, de dire quel rôle revient, dans cette progression, d'une part, aux spores entraînées précocement dans la basse tige et, d'autre part, au mycélium qui l'atteint après avoir cheminé dans le système racinaire ou aux spores

en sont issues. D'abord lente, cette progression s'accélère peu à peu. A la limite supérieure de la zone envahie, les prélèvements sériés révèlent souvent une discontinuité dans la répartition du parasite. Cela peut s'expliquer, comme le suggèrent NILSSON et NELSON (1964) par un transport de conidies (nous en avons, dans le chapitre précédent, montré la possibilité et les limites) formées dans les vaisseaux mêmes de l'oeillet; elles établissent des foyers secondaires d'infection à distance du mycélium qui leur a donné naissance.

Quelles que soient les conditions expérimentales, nous retrouvons le même type d'évolution de la progression du *P. cinerescens* dans l'oeillet :

- arrivée précoce de spores dans la basse tige
- installation très lente du parasite à ce niveau
- accélération de son extension et invasion généralisée de l'hôte.

La durée de la phase stationnaire varie, cependant, en fonction de divers facteurs. Un exemple nous est fourni par l'essai suivant : des oeillets "Lolita" âgés de 2 mois 1/2, cultivés en serre, sont infectés en décembre avec ou sans blessures, c'est-à-dire selon les modes Irb_1 ou Ir. Selon le cas, nous observons (fig. 25) que la phase stationnaire se prolonge 6 semaines pour le lot Ir, tandis qu'elle ne dure que 3 à 4 semaines pour le lot Irb_1 où les symptômes foliaires apparaissent aussi beaucoup plus précocement.

B) APRES L'APPARITION DES SYMPTOMES EXTERNES

C'est seulement quand le parasite atteint la hauteur du 10e ou 13e noeud que se manifestent, quelques noeuds plus bas, les premières taches foliaires : à ce moment, le parasite est entré dans sa phase d'extension depuis plusieurs semaines et sa progression dans le xylème est alors très rapide. L'apparition des premiers symptômes externes ne marque donc point le début de la maladie mais indique plutôt qu'elle entre dans sa phase finale, ce qui, il faut l'admettre, fait perdre une part de son intérêt au relevé des taux d'altération foliaire.

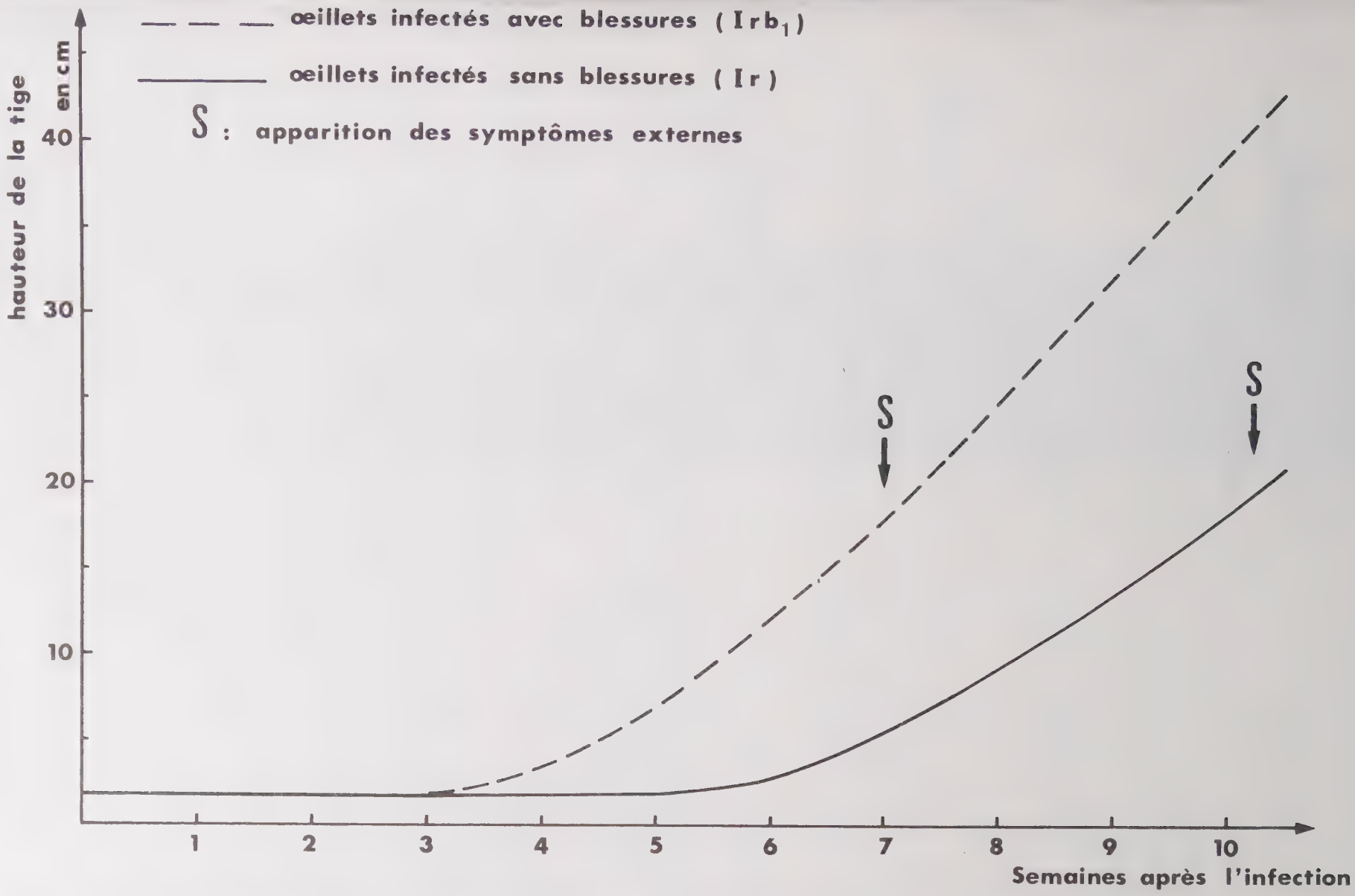


Fig. 25 . HAUTEUR MOYENNE ATTEINTE PAR LE P. CINERESCENS DANS LA TIGE D'ŒILLETS "LOLITA" INFECTÉS AVEC OU SANS BLESSURES .

La technique des prélèvements sériés nous a aussi permis de préciser la localisation du parasite par rapport aux différents symptômes :

- Symptômes internes : la gommose vasculaire est strictement liée à la présence du parasite dont l'installation dans les vaisseaux précède même nettement le brunissement du xylème : en effet, on isole encore le *Phialophora* plusieurs centimètres au-dessus de la limite supérieure des tissus brunis.

- Taches foliaires : lorsque ces symptômes externes apparaissent à un noeud, le parasite a déjà gagné un niveau beaucoup plus élevé dans la tige. On isole couramment le *P. cinerescens* de feuilles ne présentant pas encore de symptômes mais, quand une feuille est altérée, si le champignon n'est pas toujours mis en évidence au niveau des taches jaunes ou rouges, il est toujours présent à sa base au moins et on note le brunissement des nervures.

Remarque : Nous avons déjà souligné que les premières taches foliaires n'apparaissent pas sur les feuilles basales de l'oeillet mais à une certaine hauteur, du 6e au 10e noeud généralement. Nous ne pensons pas devoir attribuer ce phénomène à une résistance particulière de ces feuilles plus âgées au *P. cinerescens* mais plutôt au fait que le parasite n'y pénètre pas facilement en raison de sa localisation et de la disposition anatomique du xylème à la suite du bouturage. Les vaisseaux de ces feuilles basales se prolongent dans le xylème primaire de la tige dont les éléments, coupés lors du prélèvement de la bouture, se sont obturés près de la section au cours de l'enracinement (cf. chap. III, p. 73). Au moment de nos infections expérimentales, le parasite ne pourra donc pas s'y introduire directement. Il accède au xylème de la tige par des racines adventives formées au talon de la bouture et dont les vaisseaux se prolongent dans le xylème secondaire. Dans la partie basale de la tige, celui-ci est assez épais et l'extension latérale du parasite y reste faible; il a donc, à ce niveau, peu de chances d'atteindre les vaisseaux primaires conduisant aux feuilles basales. Plus haut, le xylème secondaire s'amincit et les taches gommeuses s'étendent. Le *Phialophora* arrive alors à gagner de larges secteurs du xylème primaire, les traces foliaires qui s'en détachent et les feuilles où sa présence cause flétrissement et chlorose (fig. 26). Cette hypothèse semble confirmée par les faits suivants :

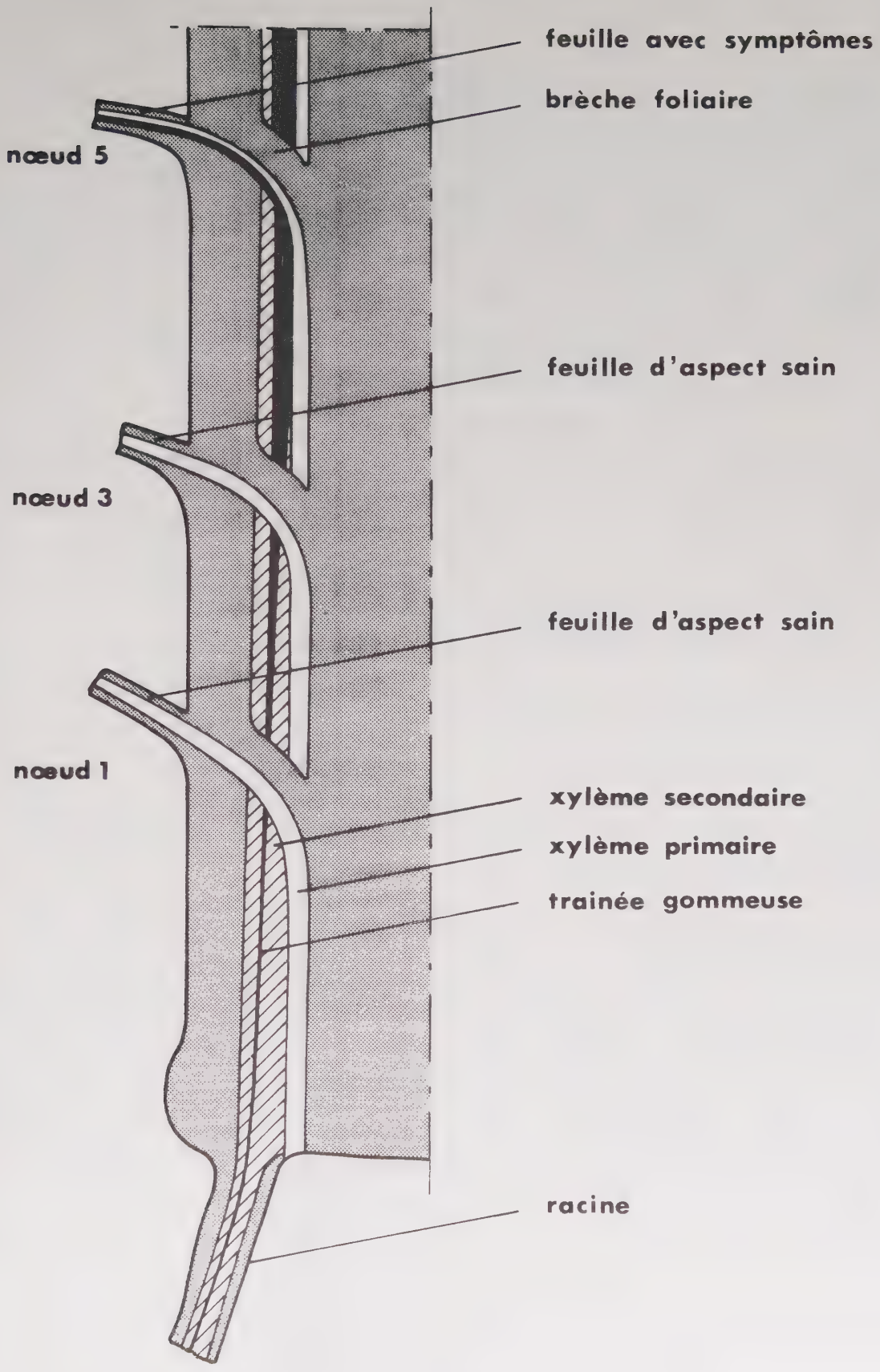


Fig. 26 EXTENSION DE LA GOMMOSE A LA BASE D'UNE TIGE D'ŒILLET.

. Dans des oeillets présentant des symptômes au dessus du 6e noeud, on n'isole pas le *Phialophora* des feuilles basales d'aspect sain et les vaisseaux de leurs traces foliaires ne contiennent pas de gommes.

. Quand, par injection dans la trace foliaire, on introduit des spores du parasite dans les vaisseaux de ces feuilles basales, celles-ci s'altèrent bientôt comme celles d'un niveau plus élevé.

. Si on infecte des jeunes plantules issues de la germination des graines, les feuilles basales jaunissent les premières.

- Courbure apicale de la tige : nous avons déjà souligné que cette déformation ne se produisait que dans le cas d'infection précoce des oeillets (cf. chap. II , p. 55). Elle est visible un peu avant ou en même temps qu'apparaissent, beaucoup plus bas, les premières taches foliaires. Il est intéressant de connaître la localisation du parasite dans la plante à ce moment. L'oeillet schématisé fig. 27 a été infecté à l'âge de 2 mois; 2 mois plus tard, il ne montre encore aucune tache foliaire mais présente une courbure apicale marquée. Dans le xylème, la gommose est visible jusqu'au 11e noeud, le niveau supérieur atteint par le parasite se situe entre les 12e et 13e noeuds alors que la courbure affecte la tige à partir du 15e noeud, soit 7 cm plus haut et il est probable que le parasite était encore plus bas quand a débuté le phénomène.

Le *P. cinerescens* a donc exercé une action à distance sur la partie apicale de la tige en perturbant le fonctionnement du méristème ou l'élongation des cellules au-dessus de lui. Comme le taux de gommose était très faible (9 %) dans ce plant et que les quelques vaisseaux obturés étaient situés sous le 11e noeud, cette cause ne peut être retenue comme ayant notablement perturbé l'alimentation en eau du secteur concerné. Une autre tentative d'explication du phénomène sera exposée dans un chapitre ultérieur (cf. chap. V).

III. DISCUSSION ET CONCLUSION

Nous avons pu décrire, pour le *P. cinerescens*, deux processus différents de pénétration dans le xylème de l'oeillet.

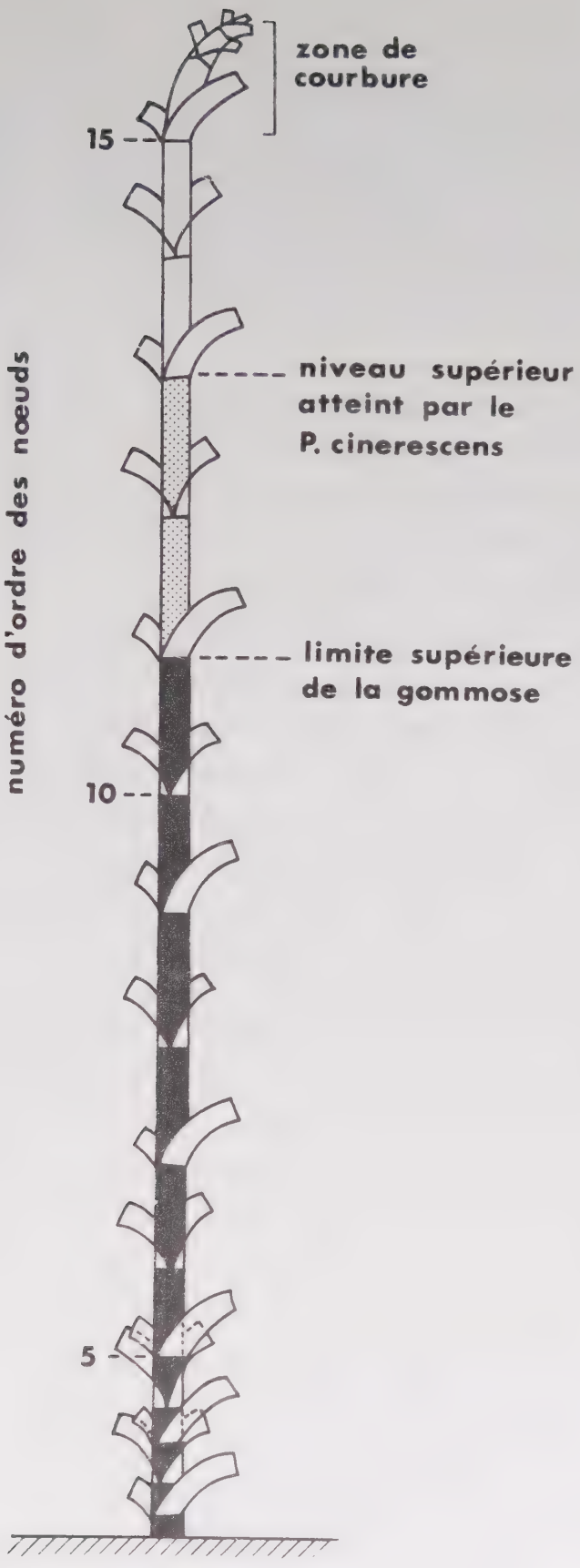


Fig. 27 **LOCALISATION DU PARASITE ET DE LA GOMMOSE**
dans un œillet précocement infecté où apparait la courbure de l'apex.
(la longueur relative des entrenœuds a été respectée sur ce schéma.)

D'une part, il peut y accéder sous forme de spores par des blessures de racines : les conidies sont introduites directement dans les vaisseaux brisés et entraînées au-dessus de la blessure par le courant ascendant de sève. C'est donc un phénomène accidentel où le champignon joue un rôle passif, mais qui assure, en un délai très bref, la présence de propagules de ce grave parasite au sein même du tissu où il se développe préférentiellement. Une telle ascension des spores dans le xylème est cependant limitée par la longueur des vaisseaux dont elles ne peuvent franchir passivement la paroi terminale. C'est pourquoi, même si un certain nombre de conidies arrivent à gagner ainsi la tige de l'oeillet, elles sont bloquées dans les premiers centimètres de sa base et ne peuvent assurer d'emblée l'infection de la plante toute entière.

C'est aussi à l'introduction de spores du *Verticillium albo-atrum* par des blessures de radicelles que DIXON et PEGG (1969) attribuent la présence de ce parasite, 24 heures après l'infection, au sommet de jeunes plants de tomate. BECKMAN *et al.* (1961, 1962) mettent en évidence la réalité de ce mode de pénétration et le blocage des spores derrière les parois transversales des vaisseaux des racines du bananier en y faisant pénétrer des conidies de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* mélangées à une suspension de carmin ou à des particules vinyliques rouges et en observant leur répartition au microscope sur coupes longitudinales; ils constatent que leur transport s'effectue sur une plus grande distance dans les vaisseaux âgés qui sont plus longs. PRESLEY et TAYLOR (1969) ont montré encore que la rapidité d'invasion de très jeunes plants de coton par le *Verticillium albo-atrum* est dépendante de l'ontogénie des vaisseaux, la présence de cloisons transversales intactes y empêchant le passage des conidies vers la partie supérieure de la plante.

Ce mode de pénétration est largement mis en jeu dans les infections expérimentales lorsque, comme le pratiquent couramment les phytopathologistes, elles s'accompagnent de sections de racines ou simplement d'un dépotage de la plante qui traumatise inévitablement le système racinaire. Dans les conditions naturelles, les blessures de racines sont fréquentes pour de multiples causes et la probabilité pour qu'intervienne ce mode d'infection n'est donc pas négligeable. Dans le cas de la fusariose du palmier à huile, RENARD (1970) estime même que l'infection se réalise exclusivement au niveau de blessures atteignant le xylème, le parasite ne pouvant pénétrer dans les racines intactes.

D'autre part, en l'absence de toute blessure, le mycélium du *P. cinerescens* est capable de traverser les assises corticales des racines pour atteindre le xylème. C'est là un phénomène biologique en rapport avec ses aptitudes pathogènes. Ce mode de pénétration exige un certain délai pour se réaliser car le *P. cinerescens* qui se développe lentement doit, en outre, passer à travers les parois de plusieurs cellules et surmonter la résistance de la plante.

Si le *Phialophora* semble incapable de traverser les assises subérifiées et le cortex qui enveloppent les racines âgées, les parties plus jeunes (méristème, zone d'élongation, zone pilifère) sont très vulnérables. C'est aussi le cas des racines du houblon (TALBOYS, 1958) et du coton (GARBER et HOUSTON, 1966), vis à vis du *Verticillium albo-atrum* et des racines du melon, vis à vis du *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (REID, 1958).

Comme l'oeillet, beaucoup de plantes tentent de s'opposer à la pénétration par l'édification de barrières physiques (TALBOYS, 1958; GRIFFITHS et LIM, 1964; GRIFFITHS et ISAAC, 1966). Ces formations sont édifiées en réponse à l'infection et sont élaborées par le cytoplasme des cellules vivantes. En 1971, GRIFFITHS a montré par l'étude au microscope électronique que les "lignitubers" des racines de tomate et de pois se développent autour des hyphes pénétrantes du *Verticillium dahliae* entre la paroi squelettique et la membrane plasmique de la cellule hôte, par déversement à travers cette dernière du contenu de nombreuses vésicules apparues dans le cytoplasme. Chez l'oeillet attaqué par le *P. cinerescens*, ces modifications de parois se développent dans l'assise pilifère mais aussi au niveau de l'endoderme où les "lignitubers" sont très nombreux. Dans les racines de houblon infectées par le *Verticillium albo-atrum*, TALBOYS (1968) relève une subérification de l'endoderme que le parasite ne traverse que très difficilement et, dans les racines de coton attaquées par le *V. dahliae*, GARBER et HOUSTON (1966) décrivent un épaississement de la paroi des cellules endodermiques qui s'emplissent de substances gommeuses. Cette assise cellulaire semble donc jouer un rôle de défense caractérisé.

Ces formations pariétales édifiées en réponse à l'infection ne sont pas spécifiques car elles sont induites dans beaucoup de plantes par des organismes variés. TALBOYS (1972) les classe parmi les "déterminants primaires de la résistance" : ils sont en effet susceptibles, au premier stade de l'infection, de bloquer la croissance des hyphes ou, au moins, de

retarder leur progression. Cependant, l'importance de leur rôle dans la résistance des plantes aux maladies a été discutée notamment par AKAI (1959) et aussi par WOOD (1967); ce dernier les considère plutôt comme des réactions de blessure car on peut provoquer leur apparition en piquant la cellule avec des microaiguilles. Si elles ralentissent l'invasion et réduisent le nombre d'hyphes atteignant le xylème, leur efficacité est insuffisante dans le cas de la verticilliose de l'oeillet car elles n'empêchent pas le *P. cinerescens* d'atteindre les vaisseaux ligneux de son hôte.

Nos infections expérimentales de plantules en culture axénique sur milieu gélosé sont réalisées dans des conditions particulièrement favorables au champignon car la jeune racine se trouve confrontée avec un inoculum important qui ne se heurte à aucune compétition avec d'autres microorganismes qu'il rencontre normalement dans le sol. Dans les conditions naturelles, le processus risque d'être plus lent et plus aléatoire. Cependant, nous avons mis en évidence l'entrée en germination, sous l'effet des exsudats racinaires de l'oeillet, des conidies du *P. cinerescens* situées dans sa rhizosphère. Une telle action des exsudats racinaires sur le développement des champignons infectant leurs hôtes par les racines a été mise en évidence dans de nombreux cas revus et discutés par SCHROTH et HILDEBRAND en 1964. Toutefois, elle est, d'une façon générale considérée comme peu spécifique car la germination de propagules d'un parasite est bien souvent déclenchée de la même façon dans la rhizosphère de plantes qui ne lui sont pas sensibles. Quoiqu'il en soit, ce phénomène augmente considérablement les chances de contact du champignon avec son hôte et les risques de pénétration.

De quelque façon que le *P. cinerescens* atteigne les vaisseaux de l'oeillet, il y poursuit son développement et nous avons suivi le rythme de sa progression. Malgré la pénétration précoce de spores dans la partie basale de la tige, l'apparition des symptômes foliaires est précédée par une phase d'incubation toujours longue de plusieurs semaines à plusieurs mois. Le *Phialophora* semble avoir des difficultés à se développer dans les racines et le bas des tiges, notamment quand l'inoculum présent dans les tissus est peu important. Nous avons d'ailleurs déjà signalé (cf. chap. II) que jusqu'à un stade avancé de la maladie, le brunissement du xylème qui révèle la localisation du parasite reste plus faible dans cette partie de l'oeillet. Sans pouvoir en préciser la cause, on peut faire quelques remarques : l'environnement auquel est soumis le champignon n'est pas identique dans

les diverses parties de la plante. L'analyse chimique met en évidence une différence dans la teneur en glucides hydrosolubles ou non selon le niveau considéré (MOREAU, CHOLLET et PERESSE, 1971); ainsi, la teneur en glucides solubles est toujours plus élevée dans la partie moyenne et la partie haute de la tige. La teneur en protéines, par contre, est plus forte dans la basse tige qu'au-dessus (GRISON, DUBOUCHET, GALLOIS et PERESSE, 1974). L'activité peroxydasique globale est toujours plus élevée dans les racines et surtout la basse tige des oeillets (GRISON, 1972). Des travaux de morphogénèse ont montré que les racines et les portions de tiges proches du système souterrain conservent un type de fonctionnement de l'information héréditaire voisin du type juvénile (NOZERAN et BANCILHON, 1974), ce qui leur confère peut-être certaines possibilités de réaction qui s'estompent dans le reste de la plante. Enfin, il semble que l'inoculum doive acquérir un certain volume, soit à la suite de sa propre croissance, soit par l'effet cumulatif de pénétrations multiples pour pouvoir surmonter la résistance de son hôte.

Après cette période pendant laquelle l'extension du *P. cinerescens* est très lente et dont la durée varie en fonction de divers facteurs, la progression du champignon s'accélère peu à peu. Mais il a déjà atteint la hauteur du 10e au 13e noeud quand les premiers symptômes foliaires apparaissent. Ce parasite revêt donc un caractère particulièrement insidieux puisque l'oeillet peut l'héberger pendant des mois dans ses racines et jusqu'à une certaine hauteur dans ses tiges sans extérioriser le moindre symptôme. Son aspect sain n'appelle pas les mesures sanitaires souhaitables or, il constitue à ce moment un foyer de contamination dans la culture pour les plants voisins et il peut être source de propagation de la verticilliose par les boutures qu'on viendrait à y prélever.

La progression du parasite vers le sommet de la tige est favorisée par son aptitude à sporuler dans les vaisseaux où des phialides et des spores ont été observées (MOREAU, 1958). Le courant ascendant de sève entraîne les conidies à distance jusqu'à ce qu'elles soient arrêtées par un obstacle (aspérité, paroi transversale); en germant, elles constituent un foyer secondaire d'infection. Cela assure au parasite une progression beaucoup plus rapide que par simple croissance mycélienne et explique sa répartition verticale discontinue dans la plante au cours de la période d'invasion. Un tel processus a été souligné dans beaucoup de cas de parasitisme

vasculaire dus au *Verticillium albo-atrum* ou au *V. dahliae* (SEWEL et WILSON, 1964; GARBER et HOUSTON, 1966; PRESLEY *et al.*, 1966), au *Fusarium oxysporum* (SCHEFFER et WALKER, 1953; REID, 1958; BECKMAN *et al.*, 1962), au *Ceratocystis ulmi* (BUISMAN, 1933; BANFIELD, 1941; POMERLEAU et MEHRAN, 1966) ou au *Ceratocystis fagacearum* (THOMSON, 1961).

Les symptômes les plus caractéristiques de la verticilliose de l'oeillet (gommose du xylème et taches foliaires) sont étroitement liés à la présence du *P. cinerescens* là où ils se manifestent. Ils ne sont pas induits à distance par ce parasite, puisque, au contraire, ils succèdent à son installation. Un cas analogue se présente dans la verticilliose du chrysanthème pour laquelle HALL et BUSCH (1971) montrent que le système vasculaire des feuilles est envahi par le mycélium du *Verticillium dahliae* avant l'apparition des symptômes. Par contre, la courbure apicale de la tige qui se manifeste dans le cas d'infection précoce des oeillets, se produit à une certaine distance en avant du mycélium parasite et résulte probablement d'un processus différent dont la nature sera discutée au chapitre V.

CHAPITRE IV

SPECIFICITE PARASITAIRE DU PHIALOPHORA CINERESCENS

ET SENSIBILITE SPECIFIQUE DE L'ŒILLET

S O M M A I R E

I. PARASITISME SPECIFIQUE DU *PHIALOPHORA CINERESCENS*

A) CONDITIONS EXPERIMENTALES

B) RESULTATS DES TESTS DE SENSIBILITE

C) DEGRE DE PENETRATION DU *P. CINERESCENS* DANS LES PLANTES TESTEES

D) DISCUSSION ET CONCLUSION

II. SENSIBILITE SPECIFIQUE DE L'OEILLET

A) PENETRATION DE MICROORGANISMES A LA BASE DE LA BOUTURE, AVANT SA CICATRISATION

B) PENETRATION DE MICROORGANISMES PAR DES BLESSURES DE RACINES

C) DISCUSSION ET CONCLUSION

III. COMPORTEMENT DE L'OEILLET VIS-A-VIS D'UN AGENT DE TRACHEOMYCOSES TRES POLYPHAGE, LE *VERTICILLIUM DAHLIAE* KLEB.

A) MISE EN EVIDENCE DU *V. DAHLIAE* DANS LES TISSUS D'OEILLETS ENVAHIS SPONTANEMENT

B) RECHERCHE DU *V. DAHLIAE* DANS LES TISSUS D'OEILLETS INFECTES EXPERIMENTALEMENT

C) ACTION PATHOGENE DU *V. DAHLIAE* SUR JEUNES OEILLETS CULTIVES *IN VITRO*

D) CONCLUSION

I. PARASITISME SPECIFIQUE DU *PHIALOPHORA CINERESCENS*

Une fois introduit dans un terrain de culture, le *P. cinerescens* semble pouvoir s'y maintenir longtemps, même en l'absence de son hôte habituel. Ainsi MOREAU (1963) rapporte qu'après une grave attaque de *Phialophora*, un sol fut laissé en jachère pendant 8 ans; le parasite y avait persisté cependant puisque, au bout de ce long délai, la première plantation d'oeillets fut à nouveau détruite par la verticilliose. On peut donc penser que le *P. cinerescens* est doué d'une remarquable longévité à moins que des hôtes intermédiaires n'assurent son maintien en l'absence d'oeillets. Or, si on sait qu'il peut subsister quelques mois dans un substrat comme la perlite (cf. chap. II) , on ne lui connaît aucune forme de résistance caractérisée telle que chlamydospores, sclérotes, zygotes. D'autre part, si, contrairemant à d'autres parasites vasculaires très polyphages, le *P. cinerescens* est un agent pathogène dangereux pour l'oeillet, il n'a jamais été signalé sur d'autres genres de plantes cultivées et sa spécificité parasitaire semble particulièrement étroite. WILLIAMS *et al.* (1940) montrent que les *Dianthus chinensis* L. et *D. barbatus* L. lui sont sensibles alors que les *D. deltoides* L. et *D. caesius* Smith seraient résistants. Après infection expérimentale de *Melandryum album*, *Lychnis chalcedonica* et *Spergula arvensis*, EBBEN (1957) n'observe aucun symptôme sur ces plantes, mais isole le *P. cinerescens* des racines de *M. album*. Des hôtes intermédiaires encore inconnus peuvent exister dans la flore spontanée, peut-être parmi les plantes de la même famille, dont un certain nombre d'espèces sont des "mauvaises herbes" communes, dans la région méditerranéenne notamment. La recherche systématique de Caryophyllacées sensibles fut commencée par MOREAU (1963) et nous avons poursuivi ce travail (PERESSE et MOREAU, 1969).

A) CONDITIONS EXPERIMENTALES

Le test de sensibilité des Caryophyllacées au *P. cinerescens* a été effectué selon 2 types d'essais dans des conditions très différentes :

- dans l'un, les plantes issues de semis ou d'éclatement de souches sont cultivées dans du terreau, en serre tempérée. Quand elles ont atteint un bon développement, quelques unes sont conservées comme témoins, les autres (de 10 à 20 le plus souvent) sont infectées selon le mode Ir. Le *P. cinerescens* est recherché dans les tiges et les racines des plantes ayant présenté les symptômes typiques d'une maladie vasculaire mais aussi, cinq à six mois après l'infection, dans celles qui conservent un aspect sain. Le degré de sensibilité des différentes espèces est apprécié d'après le pourcentage de plantes atteintes et l'extension prise par le parasite dans chacune d'elles.

- dans l'autre, les plantes issues de la germination de graines sont cultivées stérilement en tubes. Quand elles sont âgées de 1 à 2 mois, des spores de *P. cinerescens* sont déposées au voisinage des racines à l'aide d'un fil ensemenceur; des tubes non infectés constituent les témoins. En quelques semaines, les espèces sensibles présentent des symptômes foliaires et nous avons estimé le degré de leur sensibilité d'après le pourcentage de plantes atteintes, la durée d'incubation et la vitesse d'évolution des symptômes.

Dans ce cas, nous plaçons les 2 protagonistes dans des conditions très artificielles, favorables au parasite par bien des aspects: il trouve dans ces tubes un milieu nutritif qui, s'il n'est pas optimal, lui permet de produire un mycélium abondant; il évite le handicap de la fongistase et toute compétition avec les hôtes habituels du sol; dans cette enceinte limitée, il entre rapidement en contact avec une grande surface des racines de la plante. Celle-ci, par contre, est très jeune, ses organes sont peu développés, ses tissus fragiles et les conditions de culture ne contribuent pas à les endurcir. On ne pourra donc accorder valeur à ce test qu'après en avoir comparé les résultats à ceux d'essais effectués sur les mêmes espèces, mais cultivées et infectées dans les conditions plus naturelles décrites ci-dessus.

B) RESULTATS DES TESTS DE SENSIBILITE

Ils sont groupés au tableau 15 où les Caryophyllacées testées sont présentées selon la classification d'EMBERGER (1960). La concordance des résultats entre les 2 types d'essais donne toute sa valeur au test de sensibilité pratiqué sur plantules en tubes, qui semble même plus précis.

Ainsi des plantes comme les *Agrostemma githago*, *Silene nutans* ou *Dianthus deltoides* dans lesquelles la présence du *P. cinerescens* n'avait pu être décelée en serre, montrent, en tubes, quelques symptômes assez tardifs évoluant lentement. Mais des plantes tout à fait résistantes comme les *Viscaria viscosa*, *Cerastium tomentosum*, *Lychnis coronaria* ou *Cucubalus baccifer* survivent très bien en tubes (nous en avons conservé plus de 10 mois) sans aucun jaunissement des feuilles bien que leurs racines soient enveloppées par le mycélium du parasite.

Outre le *Dianthus caryophyllus* et les espèces du même genre qui lui sont toutes sensibles à des degrés divers, le *P. cinerescens* peut donc s'attaquer à d'autres Caryophyllacées comme les *Gypsophila*, *Saponaria*, *Tunica*, *Vaccaria*, *Petrocoptis* ou *Silene*. Il est frappant que toutes les espèces sensibles appartiennent à la sous-famille des Silénoïdées alors que toutes les Paronychioïdées et Alsinoïdées testées se sont montrées résistantes. Une différence apparaît encore au sein des Silénoïdées entre les 2 tribus de cette sous-famille : toutes les Dianthées sont sensibles au *P. cinerescens* la plupart à un degré élevé, quelques-unes paraissant un peu plus tolérantes. Parmi les Lychnidées au contraire, la plupart des espèces semblent résistantes, quelques-unes cependant ne sont pas complètement immunes.

C) DEGRE DE PENETRATION DU *P. CINERESCENS* DANS LES PLANTES TESTEES

Dans le cas de plantules infectées en tubes, les espèces qui ne manifestent pas de symptômes foliaires et survivent longtemps dans ces conditions, ne sont pas cependant totalement indifférentes à la présence du *P. cinerescens* : leur croissance est ralentie, elles sont moins grandes que les plantes témoins non infectées. Leurs racines brunissent et ont une ramification anormale : elles émettent un grand nombre de racines latérales mais celles-ci restent à l'état d'ébauches, le méristème cessant de fonctionner peu après leur émergence (ex : *Lychnis chalcedonica*); si elles atteignent quelques millimètres de long, elles prennent un aspect tourmenté car des ébauches racinaires, tour à tour inhibées, se forment en arrière les unes des autres, comme en sympode (ex: *Viscaria sartorii*). Beaucoup d'espèces résistantes (comme certaines espèces sensibles d'ailleurs) ont une tendance marquée à émettre des racines adventives le long de la partie inférieure

Tableau 15 : Sensibilité de diverses Caryophyllacées au *P. cinerescens*

Plantes testées	Test sur plantes en pots	Test sur plantules en tubes
Paronychioïdées		
Herniaria hirsuta L.	-	
Polycarpon tetraphyllum L.		-
Spergularia campestris Asch.		-
Spergularia marginata Kittel	-	
Alsinoïdées		
Arenaria foliosa Royle	-	
Arenaria grandiflora L.	-	
Cerastium arvense L.	-	
Cerastium tomentosum L.	-	-
Minuartia frutescens Hayek		-
Moehringia trinervia Clairv.		-
Sagina apetala Ard.	-	
Scleranthus annuus L.		-
Stellaria holostea L.		-
Silenoïdées - Lychnidées		
Agrostemma githago L.	-	+
Cucubalus baccifer L.	-	-
Lychnis chalcedonica L.		-
" *coronaria* L.	-	-
" *flos-cuculi* L.	-	-
Melandryum album (Mill) Garcke	-	
" *divaricatum* (Rchb) Fenzi	-	
**Petrocoptis grandiflora* Rothmal	++	
**Silene caucasica* Boiss.	+	+

**Silene compacta* Fish.	++	+
" *inflata* Sm.		+
" *nutans* L.	-	+
**Viscaria sartorii* Boiss.	++	-
" *viscosa* (Scop.) Asch.	-	-
Silénoïdées - Dianthées		
Dianthus arboreus L.	+++	
" *armeria* L.	++	+++
" *balbisii* Ser.	+++	
" *carthusianorum* L.	+	
" *caryophyllus* L.	+++	+++
* " *crinitus* Sm.	+	
" *deltoides* L.	-	+
" *gratianopolitanus* Villars	+	
" *geminiflorus* Loisel	+	
* " *hyssopifolius* L.	++	
" *knappii* Aschers et Kanitz	+++	++
* " *nardiformis* Janka	++	
" *seguieri* Will.	+++	
" *serotinus* Waldst.	-	++
Drypis spinosa L.		+
Gypsophila elegans Bieb.	+	
" *paniculata* L.		++
" *perfoliata*		+
Saponaria cerastioides Fisch.	+++	+++
" *ocimoides* L.	+	++
" *officinalis* L.	+	++
Tunica prolifera (L.) Scop.	+++	+++
Vaccaria segetalis (Necker) Garcke	++	+++

\+ espèce peu sensible

++ espèce moyennement sensible

+++ espèce très sensible

\- espèce résistante

* test en pot effectué par MOREAU (1963)

de la tige. A la base de l'hypocotyle, le collet est plus ou moins hypertrophié et brun.

Il est intéressant de savoir si ces plantes qui gardent un feuillage d'aspect sain hébergent ou non le *P. cinerescens* dans leurs tissus. La présence éventuelle du parasite a été recherchée, d'une part dans les tiges par mise en culture à partir de fragments sériés, après stérilisation superficielle, d'autre part, sur des coupes colorées au bleu coton faites dans les tiges et les racines. Dans les espèces sensibles, le parasite envahit progressivement tous les organes de la plante jusqu'au sommet. Le mycélium du *P. cinerescens* (avec un peu moins d'abondance peut-être) pénètre également dans les racines d'espèces résistantes comme les *Cerastium tomentosum, Cucubalus baccifer, Polycarpon tetraphyllum, Viscaria sartorii*. Bien que des "lignitubers" se développent, notamment dans l'assise pilifère et surtout l'endoderme, les hyphes traversent les cellules corticales et gagnent le xylème; un peu de gommose peut se former dans les vaisseaux, sur une longueur réduite. Les méristèmes paraissent particulièrement sensibles à la confrontation avec le *P. cinerescens* : les cellules sont envahies par un mycélium abondant, toute leur paroi s'épaissit, et les "lignitubers" y sont nombreux et très longs. On conçoit que, dans ces conditions, le fonctionnement du méristème soit rapidement entravé. Dans la tige des mêmes espèces, la présence du parasite est démontrée par mise en culture de fragments sériés, mais à la base seulement et de façon discontinue; au microscope on peut y voir des spores, parfois assez nombreuses, dans les vaisseaux, mais du mycélium n'a pu être observé.

Bien que nos recherches aient été centrées sur les Caryophyllacées, nous avons eu la curiosité de comparer, avec les précédentes, la confrontation entre le *P. cinerescens* et des plantules de tomate (cv. Super-Marmande). Pour cette Solanacée, notoirement insensible à ce parasite, tout se passe comme nous venons de la décrire chez les Caryophyllacées résistantes : absence de symptômes foliaires, mais croissance ralentie, racines brunies, émission de racines adventives. Les isolements à partir de fragments sériés des tiges montrent que le *P. cinerescens* est présent dans la zone qui porte des racines adventives et un peu au-dessus, mais ne peut être isolé du reste de l'axe feuillé.

D) DISCUSSION ET CONCLUSION

Cette étude fait ressortir que la spécificité parasitaire du *P. cinerescens* ne se limite pas au g. *Dianthus* mais s'étend à d'autres Caryophyllacées comme les *Gypsophila*, *Saponaria*, *Tunica*, *Vaccaria*, *Silene*, *Petrocoptis*. En ce qui concerne les plantes testées, cette spécificité reste cependant assez étroite puisque ces espèces sensibles appartiennent toutes à la sous-famille des Silénoïdées, la plupart à la tribu des Dianthées.

C'est justement cette sous-famille qui, d'après COURTOIS et PERCHERON (1965), possède la particularité biochimique de synthétiser des glucides rarement rencontrés dans le monde vivant, dérivés du lychnose et de l'isolychnose. Cette coïncidence frappante nous a fait penser que ces polyoses joueraient peut-être un rôle dans la spécificité parasitaire du *P. cinerescens* soit dans l' "identification" de l'hôte au niveau des racines, soit dans l'installation du mycélium dans les tissus. L'étude des constituants glucidiques hydro-solubles ou non chez l'oeillet (MOREAU, CHOLLET et PERESSE, 1971) nous a montré que lychnose et isolychnose apparaissent dans toutes les parties des plantes âgées mais ne peuvent être détectés dans les jeunes oeillets déjà sensibles pourtant au *Phialophora*. Inversement, il existe, parmi les Silénoïdées - Lychnidées, quelques espèces qui, comme le *Cucubalus baccifer*, sont résistantes à ce parasite bien qu'elles contiennent des polyoses de la série du lychnose et de l'isolychnose dans leurs racines et jusque dans leurs graines (COURTOIS et ARIYOSHI, 1960, 1962). De telles constatations nous obligent donc à renoncer à l'hypothèse d'un rapport direct entre la présence de ces sucres et la sensibilité au *P. cinerescens*.

Parmi les Caryophyllacées sensibles, beaucoup d'espèces appartiennent à la flore spontanée des régions tempérées (Saponaires, Gypsophiles, Silènes...) et sont donc capables d'assurer la persistance du *P. cinerescens* dans le sol entre deux cultures d'oeillets. L'absence de formes de résistance caractérisées chez ce champignon rend d'ailleurs improbable son maintien prolongé dans la terre sans l'intervention d'hôtes intermédiaires. L'existence et le rôle de tels hôtes ont été soulignés pour les agents de maladies diverses et notamment d'autres trachéomycoses comme les fusarioses et les verticillioses (VAN DER MEER, 1925; ARMSTRONG et ARMSTRONG, 1948; WILHELM et THOMAS, 1952; WAITE et DUNLAP, 1953; ENGELHARD, 1957; OSHIMA *et al.*, 1963; MATTA et KERLING, 1964; LACY et HORNER, 1966; BROWN et WILES, 1970; EVANS, 1971; VIGOUROUX, 1972; Mc KEEN et THORPE, 1973).

Dès 1948, ARMSTRONG et ARMSTRONG attirent l'attention sur l'existence de "porteurs sains", c'est-à-dire de plantes cultivées ou adventices des cultures, capables d'héberger dans leurs tissus des champignons pathogènes sans manifester de symptômes externes. Ils montrent, par exemple, que coton, tomate, soja, sauge, bien qu'appartenant à des familles de position systématique éloignée, peuvent héberger le *Fusarium oxysporum* f. sp. *batatas* (agent de la fusariose de la patate douce) sans paraître en souffrir. Ils isolent aussi ce parasite du trèfle mexicain, "mauvaise herbe" commune croissant parmi des patates douces atteintes de fusariose mais ne présentant aucun symptôme pathologique externe. BULIT *et al.* (1967) montrent que le *F. oxysporum* f. sp. *albedinis* (agent du bayoud du palmier dattier) parasite le henné (*Lawsonia inermis*) sans en modifier l'aspect du feuillage. Il en est de même pour le chénopode (*Chenopodium album*) quand il héberge le *F. oxysporum* f. sp. *melonis* dans les champs de melons atteints de fusariose (DUVAUCHELLE, 1970; EL MAHJOUB, 1971). KATAN (1971) démontre la présence du *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* dans les tissus de diverses plantes sauvages, en l'absence de tout symptôme pathologique et EVANS (1971) cite de nombreux cas analogues de "porteurs sains" pour le *Verticillium dahliae*. Ce sont là des hôtes intermédiaires qui passent généralement inaperçus mais sont capables, comme les plantes sensibles, de maintenir à un niveau élevé le potentiel d'inoculum d'un agent pathogène dans le sol.

Une rotation de cultures appropriée est une pratique agricole courante pour réduire ce potentiel d'inoculum dans un terrain infecté; mais il faut prendre garde à ce que l'introduction d'une plante cultivée jouant le rôle insoupçonné de porteur sain ou le développement de mauvaises herbes capables d'héberger le parasite (qu'elles manifestent des symptômes ou non), ne vienne perturber les résultats escomptés. Pour la verticilliose de la pomme de terre, MARTINSON et HORNER (1962) ont bien mis en évidence le rôle de plantes réputées insensibles pour le maintien d'un inoculum important dans des champs infectés mais non replantés en pomme de terre pendant 8 ou 10 ans.

Nos essais sur plantules en tubes nous ont montré que le *P. cinerescens* envahit les racines de nombreuses Caryophyllacées et même d'une Solanacée (la tomate) bien qu'elles ne présentent jamais de symptômes foliaires à la suite de cette infection. De telles plantes pourraient donc jouer, pour ce parasite, le rôle de porteurs sains. Toutefois, si nous pouvons affirmer

que la pénétration de leurs racines par le *P. cinerescens* est possible, les conditions très particulières de ces tests ne nous permettent pas de préjuger de l'extension que ce champignon est susceptible de prendre dans la plante placée dans les conditions naturelles d'une culture au champ.

Nous avons fait remarquer que, si le *Phialophora* pénètre dans certaines plantes sans qu'elles manifestent de symptômes foliaires, on l'isole seulement des racines et du bas des tiges. ARMSTRONG et ARMSTRONG (1948), KATAN (1971), font la même constatation en ce qui concerne les porteurs sains de *F. oxysporum* qu'ils signalent et BROWN et WILES (1970) obtiennent les mêmes résultats avec ceux du *Verticillium albo-atrum*. Il semble donc que ces champignons pathogènes soient capables de pénétrer dans les racines d'un assez grand nombre de plantes et même d'atteindre la base de leurs tiges; mais, à ce niveau, il paraît exister des mécanismes de résistance plus efficaces que seuls savent transgresser les agents pathogènes spécifiques.

II. SENSIBILITE SPECIFIQUE DE L'OEILLET

Au cours de son existence, l'oeillet se trouve à tout moment confronté avec des microorganismes très variés, notamment dans le sol, au niveau de son système racinaire. Nous avons précédemment montré (cf. chap. III) la possibilité pour les spores du *P. cinerescens*, d'être directement introduites dans les vaisseaux du xylème par des blessures des organes souterrains, puis d'y être véhiculées par la sève. Si le processus est purement mécanique, on peut s'attendre à ce qu'il fonctionne de façon comparable pour les propagules de nombreux microorganismes pourvu qu'elles aient une taille compatible avec le diamètre des vaisseaux. Ainsi, même en l'absence de toute aptitude à traverser les cellules corticales des racines par un processus biologique, ces microorganismes se trouveraient introduits au coeur même des tissus de l'oeillet. Pourtant, peu d'espèces sont capables, comme le *Phialophora cinerescens*, de nuire à son développement.

A) PENETRATION DE MICROORGANISMES A LA BASE DE LA BOUTURE, AVANT SA CICATRISATION

A la base de la bouture, une section fraîche de la tige est mise en contact direct avec un substrat d'enracinement non stérile. Les tissus blessés, les vaisseaux du xylème sectionnés transversalement sont donc exposés à la pénétration de microorganismes divers avant toute cicatrisation. Nous avons déjà souligné (cf. chap. I) la présence de contaminants internes dans les tissus de l'oeillet et l'inconvénient qu'ils représentent pour la recherche du *P. cinerescens*. On trouve en effet de nombreuses espèces fongiques et bactériennes jusque dans la partie basale de la tige. Les champignons rencontrés sont variés : les uns sont des parasites de blessures (notamment des *Fusarium* et des *Alternaria*), susceptibles de prendre quelque extension à partir de leur zone d'installation soit au talon de la bouture, soit à l'aisselle des feuilles des premiers noeuds; les autres sont des saprophytes fréquents dans le sol pour la plupart (divers *Phialophora, Cephalosporium, Gliocladium, Rhinocladiella*...) qui ont en commun leur aptitude à produire des spores de petite taille, très nombreuses, facilement entraînées par l'eau; certaines sont capables de bourgeonner. Les bactéries sont toujours présentes et appartiennent, elles aussi, à des espèces variées. Il est probable que la plus grande partie de cette flore contaminante interne trouve son origine dans une infection massive à partir du substrat au début du bouturage et a pu s'introduire au talon des boutures, dans les vaisseaux sectionnés notamment. L'observation suivante nous semble le confirmer : si on utilise, comme milieu d'enracinement, de la perlite neuve, la microflore interne des oeillets qui s'y développent, est réduite; ces plantes contiennent toujours des bactéries mais peu de champignons, quelquefois pas du tout. Si on prend au contraire de la perlite déjà utilisée et non stérilisée qui contient donc l'abondante microflore de la rhizosphère des oeillets précédents, la mise en culture ultérieure de coupes sériées de ces nouvelles boutures révèle une importante contamination interne.

Cette microflore est présente à la base des tiges seulement. Les champignons sont isolés jusqu'à 3 ou 4 cm de haut, les bactéries atteignent un niveau un peu plus élevé, leur répartition devenant alors discontinue. Ils ne progressent pas au cours de la croissance de l'oeillet. La gommose de certains vaisseaux et la redivision en un suber de cicatrisation des

cellules qui les entourent, souvent observées à la base d'oeillets présumés sains, constituent probablement une réaction de la plante à la pénétration de ces microorganismes qui restent vivants mais sont en quelque sorte prisonniers dans les tissus.

B) PENETRATION PAR DES BLESSURES DE RACINES

Au moment où nous effectuons les infections expérimentales par arrosage du sol avec une suspension infectieuse, le talon des tiges d'oeillets est cicatrisé et n'autorise plus une pénétration directe des spores à son niveau (cf. chap.III). Pour justifier la rapidité avec laquelle le *P. cinerescens* se retrouve dans les entre-noeuds inférieurs, nous avons considéré que l'introduction des spores dans les vaisseaux était possible grâce à des blessures spontanées des racines, leur transport étant assuré par le courant de sève. Nous avons donc tenté de contrôler si cela se produisait de la même façon pour les spores de quelques champignons non pathogènes de l'oeillet. (MOREAU et PERESSE, 1972).

1 - Les champignons utilisés

Plusieurs critères ont orienté notre choix :

- taille des spores : voisine de celles du *P. cinerescens* qui ont de 4 à 8 µ de long, compatible avec un éventuel transport dans les vaisseaux de l'oeillet qui ont de 5 à 25 µ de diamètre.

- abondance et mouillabilité des spores : permettant d'obtenir rapidement un inoculum aisément mis en suspension dans l'eau, de concentration facile à contrôler.

- vitesse de croissance et aptitude à la compétition : suffisante pour que le champignon, s'il est présent, ne soit pas inhibé ou masqué dans les boîtes d'isolement par des concurrents éventuels.

- facilité d'identification : grâce à un aspect cultural ou microscopique assez caractéristique pour reconnaître rapidement, sans confusion possible, l'espèce recherchée.

En raison de ces critères, parmi des champignons non pathogènes de l'oeillet, nous avons retenu les espèces suivantes :

- le *Gliocladium roseum* Bain. au pouvoir antibiotique marqué vis-à-vis de nombreux microorganismes.

- le *Myrothecium verrucaria* (Alb. et Schw.) Ditmar ex Fr., agent cellulolytique puissant.

- le *Verticillium lateritium* Berk., commun dans les sols et les débris végétaux où il est compétitif.

- le *Phialophora richardsiae* (Nannf.) Conant, de position systématique proche du *P. cinerescens*.

- le *Verticillium dahliae* Kleb., parasite vasculaire non virulent sur oeillet d'où, cependant, il a parfois été isolé (PERESSE, MOREAU et EL MAHJOUB, 1971).

Des infections avec le *P. cinerescens* sont pratiquées parallèlement dans nos essais.

2 - Les oeillets

Trois essais successifs ont été effectués avec des oeillets Sim cv. "Coronation".

- 1er essai : les oeillets avaient 2 mois 1/2 au moment de l'infection; maintenus en serre tempérée mais en période hivernale, leur croissance est restée lente au cours de l'essai.

- 2e et 3e essais : les oeillets avaient 4 mois au moment de l'infection effectuée en avril. Dans ces conditions, les plantes ont atteint au cours de l'essai leur phase accélérée de croissance, la plus favorable à l'envahissement par le *P. cinerescens* et à l'expression des symptômes (cf. chap. II).

3 - Mode d'infection

L'infection a été pratiquée selon le mode Ir dans les deux premiers essais, Irb_1 dans le troisième, avec des suspensions contenant 30.10^6 spores/ml.

4 - Recherche du champignon dans la tige de l'oeillet

Après infection, le champignon est recherché dans 2 ou 3 plantes chaque fois au bout de 2, 6, 10, 15 jours puis tous les 15 jours pendant 10 semaines pour le 1er essai et 8 semaines pour le 2e, moins régulièrement mais jusqu'à 12 semaines pour le 3e. 30 à 50 coupes sériées sont prélevées à la base de la tige de chaque plante (de 0 à 15 cm de hauteur environ) et incubées de la façon habituelle pour le *P. cinerescens*. Pour les autres champignons, les coupes sont déposées sur milieu de malt à 2 % et incubées à 22° C. Ces essais ont nécessité l'examen de plusieurs milliers de coupes.

5 - Résultats

a) Contrôles préliminaires

- Des tiges d'oeillets sont coupées au ras du collet et leur section est plongée 24 h dans une suspension de spores de l'un des champignons retenus pour nos essais. Celui-ci est alors recherché dans la tige par la méthode des coupes sériées : on le retrouve régulièrement plusieurs centimètres au-dessus de la section. Il est ainsi établi que toutes les espèces fongiques retenues ont des spores aptes à être véhiculées dans les vaisseaux de l'oeillet et capables de se développer sur un milieu convenable à partir des fragments de tissu ligneux qui les contiennent.

- 24 h après injection dans la tige, à l'aide d'une seringue hypodermique (méthode d'infection Iti), d'une suspension de spores de *G. roseum* ou *V. dahliae*, ces champignons y sont retrouvés à quelques centimètres de part et d'autre du point d'inoculation. Au bout de 30 jours, on les retrouve toujours dans la même zone : si aucune extension n'a lieu, leur aptitude à survivre un mois au moins dans le xylème de l'oeillet est démontrée.

b) 1er essai

Les résultats de la recherche des champignons introduits sont mentionnés au tableau 16 qui indique, pour chacun des plants étudiés, le nombre de coupes où a été mis en évidence le champignon concerné.

Tableau 16 - 1er essai : Recherche dans les tiges d'oeillets "Coronation des champignons introduits dans le sol par arrosage avec une suspension de spores. (Pour chaque oeillet, 30 à 50 coupes sont prélevées dans la partie inférieure de la tige, jusqu'à 15 cm de hauteur environ).

Nombre de jours après l'infection	Nombre de coupes où le champignon est mis en évidence dans chacun des deux plants de chaque contrôle.				
	P. cinerescens	*P. richardsiae*	*G. roseum*	*V. lateritium*	*M. verrucaria*
2	5 - 7	0 - 0	11 - 7	1 - 1	0 - 0
6	10 - 0	1 - 0	0 - 3	0 - 2	0 - 2
10	pas de contrôle	0 - 0	3 - 0	0 - 5	4 - 0
30	9 -12	0 - 0	4 -17	0 - 0	2 - 0

Le parasite et les 4 espèces non pathogènes sont retrouvés dans les tiges d'oeillet (d'ailleurs de façon discontinue et à la base des tiges seulement) mais à des degrés divers. Avec le *P. cinerescens*, le nombre de plants où le champignon est mis en évidence est plus élevé et, dans chacun d'eux, le nombre de coupes à partir desquelles il est mis en culture est plus grand qu'avec les autres espèces. Notons que le *G. roseum* est aussi retrouvé fréquemment dans la tige alors que le *P. richardsiae* dont les spores sont pourtant plus petites que celles du *P. cinerescens* n'est retrouvé qu'une seule fois.

c) 2ème essai

Les résultats en sont portés au tableau 17 .

Le *P. cinerescens* est retrouvé dans les oeillets aussi régulièrement que dans l'essai précédent. Le *G. roseum* n'y est que rarement mis en évidence, le *P. richardsiae* n'y a pas été retrouvé.

Tableau 17 - 2ème essai : Recherche, dans les tiges d'oeillets "Coronation", des champignons introduits dans le sol par arrosage avec une suspension de spores. (Pour chaque oeillet, 30 à 50 coupes sont prélevées dans la partie inférieure de la tige, jusqu'à 15 cm de hauteur environ).

Nombre de jours après l'infection	Nombre de coupes où le champignon est mis en évidence dans chacun des trois plants de chaque contrôle		
	P. cinerescens	*P. richardsiae*	*G. roseum*
2	0 - 0 - 1	0 - 0 - 0	0 - 0 - 0
6	2 - 4 - 1	0 - 0 - 0	0 - 0 - 5
10	2 - 0 - 2	0 - 0 - 0	0 - 0 - 0
15	6 - 0 - 9	0 - 0 - 0	0 - 1 - 0
30	30 - 0 - 3	0 - 0 - 0	0 - 0 - 2

d) 3ème essai

Nous avons, cette fois, tenté de faire pénétrer des spores du *V. dahliae* dans les oeillets. L'infection s'accompagnant de la rupture de radicelles,on pouvait espérer des résultats meilleurs que dans les essais précédents, les blessures devant favoriser l'accès direct des spores aux vaisseaux. Cependant, le *V. dahliae* n'a pu être mis en évidence dans les tiges d'oeillets au cours des isolements successifs.

C) DISCUSSION ET CONCLUSION

La base des boutures est facilement contaminée avant sa cicatrisation par les microorganismes du sol mais le développement de toutes ces espèces non pathogènes pour l'oeillet est rapidement arrêté et elles se trouvent bientôt emprisonnées dans les tissus par des secrétions de gommes et la formation, autour d'elles, d'un suber de cicatrisation.

Après cicatrisation de la base de la bouture, l'accès rapide de spores du *P. cinerescens* aux vaisseaux de la tige reste possible (à la faveur de blessures des racines), ce qui confirme nos résultats antérieurs; mais n'importe quelle espèce ne semble pas atteindre aussi aisément la tige de l'oeillet. Ainsi, bien qu'apportés au substrat dans les mêmes conditions, on ne retrouve que rarement dans les premiers entre-noeuds le *G. roseum*, le *M. verrucaria*, le *P. richardsiae*, le *V. lateritium* ou le *V. dahliae*. Pourtant, nous avions préalablement vérifié la possibilité d'ascension de leurs spores dans le xylème de la tige et constaté que leur incubation sur les coupes ne gênait pas leur développement. Existerait-il donc un facteur dont nous ne soupçonnons pas la nature et qui favoriserait la pénétration des spores du *P. cinerescens*?

Pensant à un phénomène de nature physique, LAYEC et WOLF (1971) établissent que les spores de ce *Phialophora* sont chargées électriquement. Ces charges sont-elles de nature à faciliter la pénétration du parasite dans l'oeillet?

On peut aussi penser à une réaction de nature biochimique à laquelle échapperait le *Phialophora* et qui affecterait la survie des propagules d'autres espèces. Puisque les espèces ayant pénétré dans la tige lors du bouturage s'y maintiennent en vie, que les spores entraînées par l'eau dans les tiges coupées germent bien dans les coupes qu'on y prélève, que les spores de *G. roseum* et du *V. dahliae* injectées dans la tige de l'oeillet y survivent (essais préliminaires), c'est peut-être dans les racines plus que dans les tiges que pourrait intervenir cette réaction, si elle existe. On pourrait alors envisager deux niveaux de résistance pour l'oeillet : dans les racines où sont filtrées la plupart des espèces, même à petites spores mais où le *Phialophora* ne déclenche pas ou bloque le "système d'alerte" que les introductions étrangères provoquent, et au niveau des entre-noeuds inférieurs de la tige où les non parasites peuvent survivre (vraisemblablement prisonniers) sans pouvoir s'étendre dans le xylème adjacent et où le *Phialophora* doit visiblement affronter des difficultés variées qu'il surmonte (longue incubation). C'est à une conception analogue que conduisent les résultats de MALAMUD et O'KEEFE (1971) qui, pour la verticilliose de la pomme de terre, envisagent deux niveaux de résistance distincts dans la racine et dans la tige de l'hôte.

Toutefois, il faut considérer que le nombre de spores qui atteignent la tige après arrosage du sol avec une suspension de spores est très faible (ce qui n'est pas le cas dans nos essais préliminaires). Si elles sont enfouies dans l'épaisseur de la coupe, ces spores isolées n'y ont peut-être pas la possibilité de se développer suffisament pour atteindre le milieu de culture et leur présence reste ignorée. Par contre, dans la même situation, les spores du *P. cinerescens*, parasite spécifique de l'oeillet, en seraient moins affectées et leur présence se manifesterait régulièrement par le développement d'un thalle dans le milieu de culture. Ces considérations ne sont peut-être pas à exclure pour justifier qu'on isole le *P. cinerescens* plus fréquemment que les autres espèces testées à la base des tiges de l'oeillet.

L'oeillet est donc confronté avec de nombreux microorganismes, non seulement au niveau du rhizoplan mais aussi au coeur même de ses tissus que des propagules peuvent atteindres en s'introduisant par des blessures dans les vaisseaux ligneux rompus. Si, d'une façon générale, les mécanismes de défense dont il dispose sont efficaces et bloquent rapidement leur développement, ils sont insuffisants dans le cas exceptionnel de quelques espèces qui, comme le *P. cinerescens*, envahissent le tissu vasculaire et pour lesquelles l'oeillet manifeste une sensibilité spécifique. Ainsi que le souligne BECKMAN (1964) " la résistance est la règle et la sensibilité l'exception" et la spécificité parasitaire dépend à la fois des caractères des deux partenaires, les uns propres au parasite, les autres à l'oeillet.

III. COMPORTEMENT DE L'OEILLET VIS A VIS D'UN AGENT DE TRACHEOMYCOSES TRES POLYPHAGE, LE *VERTICILLIUM DAHLIAE* KLEB.

Comme le *Phialophora cinerescens*, le *Verticillium dahliae** est un parasite vasculaire. Il est l'agent de graves trachéomycoses qui affec-

---

* Sans entrer dans la discussion pour savoir si on doit faire du *V. dahliae* et du *V. albo-atrum* deux espèces distinctes ou non, nous désignerons comme ISAAC (1967) sous le nom de *V. dahliae* les *Verticillium* qui, outre des phialides en verticilles et des hyphes à paroi sombre, forment aussi des microsclérotes.

tent, en zone tempérée notamment, un grand nombre de plantes cultivées ou non,appartenant à des groupes systématiques très variés (ENGELHARD, 1957; EVANS, 1971). C'est donc un parasite très polyphage contrairement au *P. cinerescens* qui, jusqu'à présent, est reconnu pathogène de quelques Caryophyllacées seulement, appartenant toutes à la même sous-famille.

On ne connaît au *V. dahliae* que des modes de reproduction asexuée. C'est un Imparfait dont les nombreuses conidies ovales et hyalines ont une taille voisine de celle des spores du *P. cinerescens* (4,5 à 7 µ de long et 2,5 à 3,5 µ de large). Il forme, en outre, de nombreux microsclérotes noirs, organes de résistance capables d'assurer sa survie en conditions défavorables.

Le thalle de *V. dahliae* présente une croissance optimale vers 22-24° C (ISAAC, 1949; SCHNATHORST, 1971), beaucoup plus rapide que celle d'un thalle de *P. cinerescens* qui, même dans les meilleures conditions, ne croît que très lentement.

Les conidies du *V. dahliae* germent aussi beaucoup plus rapidement que celles du *P. cinerescens* : ainsi nous avons nous-même constaté que, à 22° C, en goutte pendante dans une solution de Czapek contenant 2g/litre de saccharose (milieu pauvre en sucre comme l'est d'ailleurs la sève ascendante dans les vaisseaux du xylème), la germination des spores du *Verticillium* débute au bout de 6 heures environ, celle des spores du *Phialophora* au bout de 20 à 22 heures seulement. En outre, ce n'est qu'après 3 ou 4 jours, dans ces conditions, que de nouvelles spores naissent sur les jeunes thalles du *Phialophora* alors qu'il s'en forme déjà en 16 heures sur les thalles du *Verticillium*, une hyphe germinative pouvant se transformer directement en une phialide qui émet une spore à son extrémité.

Apte à se développer dans les vaisseaux de plantes très diverses, formant des conidies abondantes de taille comparable à celle des spores du *P. cinerescens*, germant en quelques heures en un thalle à croissance rapide capable de resporuler en un délai très court, le *V. dahliae* semble donc nettement avantagé par rapport au *Phialophora* pour pénétrer et envahir le xylème de l'oeillet. Or, ce parasite ne figure pas parmi les agents pathogènes de cette plante alors que le *P. cinerescens* est l'un des plus graves. L'observation suivante nous semble, à cet égard, particulièrement significative : nous avons eu l'occasion de récolter des oeillets et des aubergines poussant côte à côte dans une même parcelle de terre et présentant des symptômes de verticilliose; or, la mise en culture des tissus malades a montré que les

aubergines hébergeaient le *V. dahliae* alors que les oeillets étaient attaqués par le *P. cinerescens* (PERESSE et MOREAU, 1969).

Pourtant, la présence du *V. dahliae* dans les oeillets a parfois été signalée (ROBINSON, 1961) et nous l'y avons nous-même fortuitement rencontré. Afin de préciser dans quelle mesure des relations peuvent s'établir entre l'oeillet et ce champignon, nous avons donc recherché sa présence dans des oeillets après infection spontanée éventuelle d'une part et après infection expérimentale d'autre part (PERESSE, MOREAU et EL MAHJOUB, 1971).

A) MISE EN EVIDENCE DU *V. DAHLIAE* DANS LES TISSUS D'OEILLETS ENVAHIS SPONTANEMENT

Elle a été effectuée dans une plantation d'oeillets pratiquée sous serre, dans la région brestoise, culture qui succédait à des tomates et des concombres gravement attaqués par le *V. dahliae* : un inoculum important devait donc subsister dans le sol non désinfecté avant la mise en place des oeillets. Ces conditions nous ont paru favorables pour préciser le rôle pathologique éventuel du *Verticillium* sur oeillet dans cette plantation qui en contenait plusieurs milliers de pieds.

Nous avons, à quatre reprises, de février à juillet (date de leur arrachage), récolté des oeillets (cv. "William Sim" et "Laddie") pour y rechercher le *V. dahliae*. Ce champignon a été mis en évidence dans :

7 plants sur 14 en février
9 " " 16 en mars
2 " " 4 en mai
0 " " 8 en juillet

Plus de la moitié des plants (sauf en juillet) hébergeaient ce *Verticillium*, le plus souvent dans la tige principale, mais aussi dans les rameaux latéraux. Cependant, il ne nous a pas été possible de distinguer des symptômes pathologiques particuliers. En effet, les oeillets prélevés présentaient bien des rameaux fanés mais qui furent, à la dissection et à l'isolement, toujours justifiés par des attaques de *Fusarium roseum* (*culmorum*) sur plaies de coupes de fleurs. D'ailleurs au cours de nos visites régulières dans cette serre, de janvier à juillet, la plantation a évolué normalement, compte-tenu de la fusariose. Ainsi, malgré sa présence fréquente dans les

plantes, le *V. dahliae* ne nous a pas paru causer de pertes sensibles dans la culture, ce qui confirme le peu d'importance que lui accorde ROBINSON (1961) vis-à-vis de l'oeillet.

B) RECHERCHE DU *V. DAHLIAE* DANS LES TISSUS D'OEILLETS INFECTES EXPERIMENTALEMENT

Des oeillets "Sim Coronation", âgés de 4 mois sont infectés avec l'isolat de *V. dahliae* issu d'oeillets (cf. ci-dessus A).

1 - Infection au niveau des racines

Chaque plant est légèrement soulevé de son substrat pour briser quelques racines et chaque pot reçoit 30 ml d'une suspension infectieuse. Celle-ci est obtenue par broyage dans l'eau d'une culture sur milieu gélosé de malt à 2 %; elle contient, outre des fragments de mycélium et des microsclérotes, environ 3.10^6 spores par ml. Le parasite est recherché systématiquement dans la tige de 3 plantes les 3e, 9e, 15e, 30e et 65e jours après l'infection et on contrôle parallèlement sa persistance dans la perlite.

Le *V. dahliae* n'a jamais été retrouvé dans les tiges et aucune plante n'a présenté de symptômes pathologiques durant ce laps de temps, malgré le maintien d'un inoculum important dans le substrat. L'infection a donc échoué dans ces conditions expérimentales normalement très favorables à l'installation du *P. cinerescens*.

2 - Infection au niveau de la tige

Elle est réalisée par injection de spores à l'aide d'une seringue hypodermique (méthode Iti) entre 4 et 8 cm au-dessus du sol. La suspension de spores est obtenue par lessivage superficiel d'une culture de *V. dahliae* sur milieu gélosé; elle contient 8.10^6 spores par ml. Des prélèvements sériés, effectués dans 2 plants chaque fois, précisent la localisation du champignon dans la tige les 1er, 7e, 15e, 22e et 80e jours après l'infection (fig. 28). Au bout de 24 h, on l'isole sur quelques centimètres de part et d'autre du point

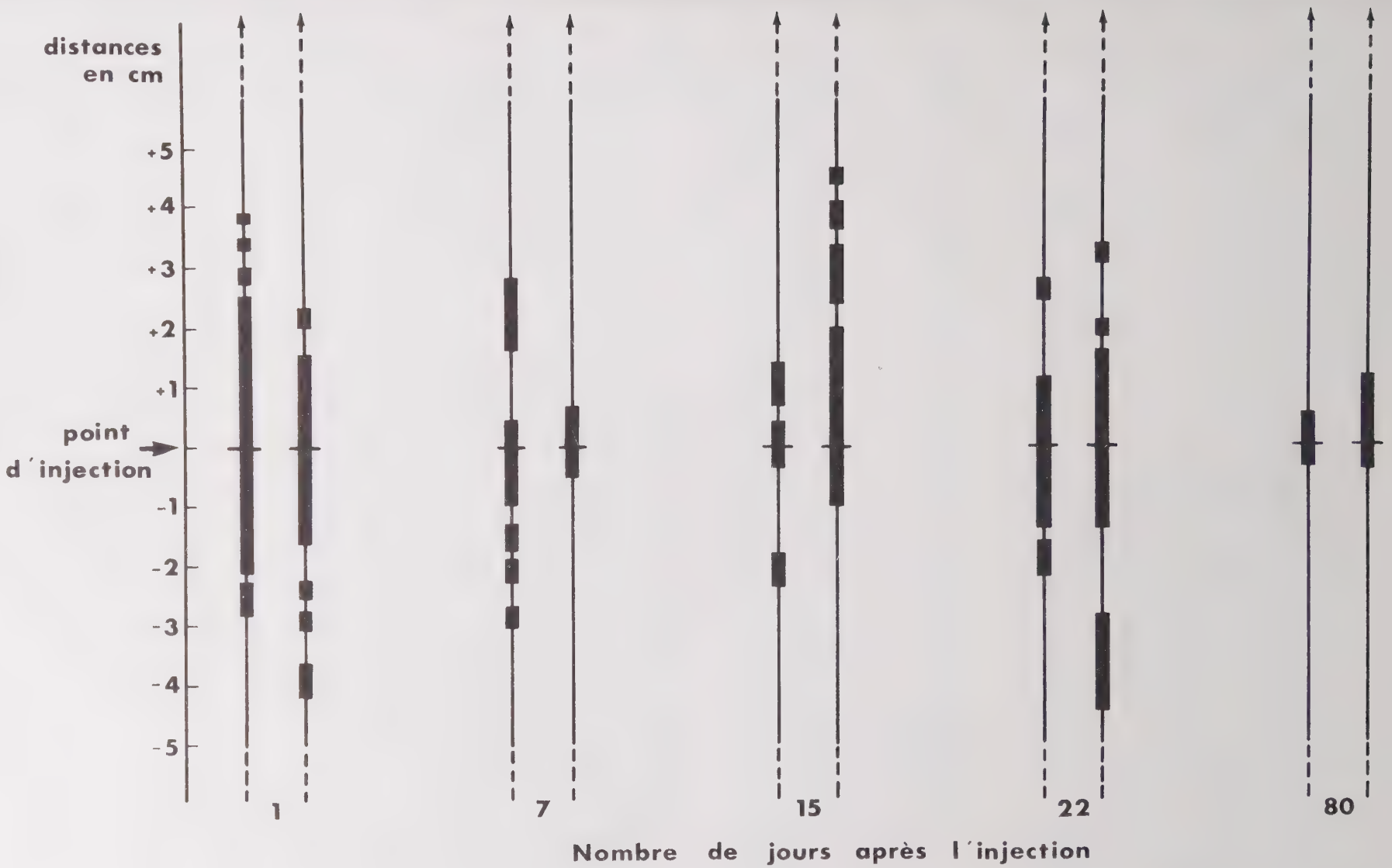


Fig. 28 LOCALISATION DU VERTICILLIUM DAHLIAE DANS LES TIGES D'ŒILLETS OÙ ON A INJECTÉ UNE SUSPENSION DE SPORES. (2 plants sont testés à chaque contrôle)

d'injection des spores, d'abord d'une façon continue puis avec discontinuité. Par la suite, on ne constate aucune extension du champignon dans la plante qui poursuit normalement sa croissance sans manifester de symptômes pathologiques. D'ailleurs, au bout de 80 jours, le *V. dahliae* n'est plus mis en évidence qu'au voisinage immédiat de la blessure initiale.

Malgré l'introduction directe de ses spores dans la tige, le *V. dahliae* n'a pu coloniser le xylème de l'oeillet comme le fait le *P. cinerescens* dans les mêmes conditions; il y survit cependant quelques mois.

C) ACTION PATHOGENE DU *V. DAHLIAE* SUR JEUNES OEILLETS CULTIVES *IN VITRO*

Des oeillets "Chabaud, Carmen" obtenus par germination de graines sur milieu gélosé, sont cultivés en tubes, en conditions axéniques. L'infection est réalisée quand les plantes sont âgées de 1 mois 1/2 : deux isolats du *V. dahliae* ont été utilisés, l'un issu d'oeillet, l'autre de concombre.

Le mycélium présente une croissance intramatricielle et atteint les racines en quelques jours. Après deux semaines, alors qu'aucun symptôme pathologique ne se manifeste, des coupes longitudinales montrent que, dans les racines, le mycélium a traversé l'assise pilifère, le parenchyme cortical, l'endoderme et commence à atteindre les vaisseaux du bois. Là où les hyphes traversent les parois cellulaires, notamment au niveau de l'endoderme, des épaississements pariétaux ("lignitubers") tentent parfois de s'opposer à leur pénétration. Dans les tissus, le mycélium n'est jamais luxuriant, il sporule rarement mais différencie quelques microsclérotes.

Six semaines seulement après l'infection apparaissent les premiers symptômes foliaires : jaunissement puis nécrose des feuilles. Les racines sont alors jaunâtres et le collet fortement bruni. Ultérieurement, la plante se déssèche complètement. L'évolution de ces symptômes est la même avec les deux isolats de *Verticillium*; elle est beaucoup plus rapide quand de tels oeillets sont infectés avec le *Phialophora*.

Dans les conditions très particulières de ces essais en tubes, favorables pour le champignon et défavorables pour l'hôte, le *V. dahliae* arrive à provoquer chez ces oeillets "Chabaud" des symptômes pathologiques mais se montre cependant moins virulent que le *P. cinerescens*.

D) CONCLUSION

Comme le *P. cinerescens*, le *V. dahliae* est capable de pénétrer dans de jeunes radicelles d'oeillets et d'assurer, quoique plus lentement, une infection généralisée de plantules cultivées en tubes où elles se trouvent, il est vrai, dans une situation qui les défavorise. Dans des conditions normales de culture, bien que sa présence soit relativement fréquente jusque dans les tiges d'oeillets plantés en sol infecté par le *V. dahliae*, ce champignon n'y est jamais très étendu et n'y cause aucun dommage visible. En outre, nos essais d'infection de plantes adultes par les racines ou par la tige ont toujours échoué.

L'oeillet se trouve donc, vis-à-vis du *V. dahliae*, dans une situation analogue à celle de quelques Caryophyllacées comme les *Agrostemma githago*, *Silene nutans* ou *Dianthus deltoides* vis-à-vis du *P. cinerescens*: attaquées par ce parasite, elles manifestent, en tube, des symptômes tardifs évoluant lentement mais, cultivées en conditions normales, elles ne présentent aucune altération malgré l'apport d'une quantité importante d'inoculum dans leur substrat.

Ainsi, le *V. dahliae*, apte à provoquer des symptômes graves sur de nombreux hôtes de position systématique éloignée et paraissant, *a priori*, le mieux adapté pour assurer l'infection généralisée du xylème de l'oeillet rencontre chez cette plante une résistance qui n'arrête pas le *P. cinerescens*; à ce dernier, pourtant, on ne connaît jusqu'à présent, qu'une gamme d'hôtes particulièrement restreinte. Cela confirme l'originalité des rapports hôte-parasite dans le couple oeillet-*Phialophora*. Il nous semble que l'étude comparée du comportement des deux champignons dans l'oeillet d'une part, des réactions de la plante vis-à-vis de ces deux parasites d'autre part, puisse constituer une voie intéressante pour essayer de cerner les facteurs déterminant l'arrêt du processus pathologique ou autorisant au contraire la poursuite de son déroulement.

CHAPITRE V

QUELQUES ASPECTS DES RELATIONS HOTE-PARASITE

ET DES MECANISMES DE RESISTANCE CHEZ L'ŒILLET

S O M M A I R E

I. EXAMEN MICROSCOPIQUE DES TISSUS MALADES : COMPORTEMENT DU *P. CINERESCENS* DANS LES VAISSEAUX ET REACTIONS PATHOLOGIQUES DANS LE XYLEME

A) APRES INFECTION AU NIVEAU DES RACINES

B) APRES INTRODUCTION DE SPORES PAR ENTAILLE DE LA TIGE

II. CONTRIBUTION DE L'ANALYSE CHIMIQUE

A) METABOLISME GLUCIDIQUE DU *P. CINERESCENS*

B) ANALYSE DES OEILLETS INFECTES

III. CONTRIBUTION DE LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

A) TECHNIQUES UTILISEES

B) OBSERVATION DU XYLEME D'OEILLETS SAINS

C) OBSERVATION DU XYLEME INFECTE

D) CONCLUSION

IV. CONTRIBUTION DE TRAVAUX DE PHYSIOLOGIE CONCERNANT LA CROISSANCE

V. TENTATIVE D'APPROCHE DES MECANISMES DE RESISTANCE CHEZ L'OEILLET

A) ETUDE COMPAREE DU XYLEME DE TIGES D'OEILLETS INOCULEES AVEC DES SPORES DU *V. DAHLIAE* OU DU *P. CINERESCENS*

B) ESSAIS D'INFECTION CROISEE

VI. CONCLUSIONS

Nous avons déjà souligné que l'oeillet n'est pas, pour le *P. cinerescens*, un substrat inerte. La présence du parasite provoque dans les tissus vivants de la plante d'importantes réactions. Certaines se traduisent par des modifications histologiques dont nous avons fait l'étude microscopique en essayant de préciser leur évolution dans le temps et dans l'espace en fonction de la progression du champignon. Des informations nouvelles ou complémentaires fournies par la collaboration de spécialistes en microscopie électronique, de physiologistes, de chimistes, ont été fructueuses dans cette approche des interactions complexes qui s'établissent entre le parasite et son hôte et dont les symptômes pathologiques sont l'expression parfois tardive.

I. EXAMEN MICROSCOPIQUE DES TISSUS MALADES : comportement du *P. cinerescens* dans les vaisseaux et réactions pathologiques dans le xylème.

A) APRES INFECTION AU NIVEAU DES RACINES

L'observation du parasite dans les tissus de l'hôte et l'étude des modifications histologiques consécutives à l'infection au niveau des racines ont été faites par MOREAU (1957, 1963). Nos observations personnelles confirment cette description que nous résumons ci-dessous.

1 - Le parasite

Dans le xylème de l'oeillet on trouve les hyphes du *P. cinerescens* dans les vaisseaux; elles passent par les ponctuations dans les éléments vasculaires adjacents. Des phialides et des spores y ont aussi été observées. Le parasite reste longtemps confiné aux vaisseaux exclusivement, mais quand la maladie atteint un stade d'évolution avancé, le mycélium passe dans les cellules du parenchyme ligneux et se développe même dans la moelle qui se creuse de lacunes où il sporule abondamment en formant ses

pinceaux caractéristiques. Ses fructifications à la surface du collet n'ont été que rarement observées.

2 - Modifications histologiques de l'hôte

Dans les oeillets atteints par le *P. cinerescens*, se manifestent d'importantes modifications des tissus :

- formation de "gommes" de composition complexe qui obstruent les vaisseaux, imprègnent le parenchyme ligneux, le cambium et même le liber selon le degré d'attaque; cette gommose donne aux tissus une coloration brun-cannelle

- modification de la répartition et de la composition du complexe lignifiant : au voisinage du parasite, les tissus déjà lignifiés perdent leur réponse positive à la réaction de Maüle. L'infection provoque une secondarisation hâtive et une lignification accrue du xylème. Chez certaines variétés la tendance à former des nodules cribo-vasculaires supplémentaires est exacerbée.

- développement de formations péridermiques qui, encerclant les zones malades, tendent à les isoler par un véritable suber de cicatrisation ou à les expulser.

- déviation de la synthèse des pigments : l'abondance des anthocyanes est particulièrement remarquable dans les cultivars à fleurs grenat ou violet.

Toutes ces modifications histologiques observées par MOREAU dans des oeillets de diverses variétés, cultivés en pleine terre et naturellement infectés, nous les avons retrouvées dans les oeillets non pincés, âgés de moins d'un an, cultivés en serre et infectés expérimentalement au cours de nos essais. Nous ne préciserons ici que quelques remarques concernant les phénomènes d'hypertrophie et d'hyperplasie qui se manifestent fréquemment dans les tissus infectés.

Au voisinage des éléments occupés par le champignon, les cellules du parenchyme ligneux se divisent activement, phénomène qui tend à isoler, voire à expulser les tissus malades; les cellules de la moelle peuvent être concernées et l'activité du cambium s'intensifier.

Fig. 29 : Xylème d'une tige d'oeillet infecté (Ir) par le *P. cinerescens* (coupe transversale).

Les tissus malades, imprégnés de "gommes", sont isolés dans une sorte de nodule par des tissus néoformés.

On observe fréquemment, au sein du xylème, l'encerclement complet des éléments gommeux par des tissus néoformés. Sur coupe transversale, on voit alors (fig. 29) des sortes de nodules constitués d'un noyau de xylème dont tous les éléments sont imprégnés de "gommes", enveloppé d'un manchon de cellules disposées en files radiales où l'on distingue deux zones concentriques : la zone la plus interne (la plus large) est formée de grandes cellules hypertrophiées, recloisonnées, à paroi subérifiée, qui ont subi une dégénérescence pycnotique : leur cytoplasme est peu dense, très vacuolisé, leur noyau contracté, sans nucléole visible, à amas chromatiniens très nets. La zone la plus externe est constituée de longues cellules aplaties, à paroi mince, à cytoplasme dense, à noyau fusiforme finement réticulé avec 1 à 3 nucléoles.

Les tissus voisins sont comprimés par la mise en place de ces formations qui, si elles sont très importantes, provoquent l'éclatement de la tige qui se fissure (fig. 10).

De telles formations se produisent chez l'oeillet sous l'action d'autres parasites vasculaires comme le *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (ANDREUCCI, 1963), le *Pseudomonas caryophylli* (HELLMERS, 1958); elles ont été observées chez diverses plantes attaquées par des *Fusarium, Verticillium, Ceratocystis* etc..., et sont souvent accompagnées de thylloses (TALBOYS, 1958; CHAMBERS et CORDEN, 1963). Ces réactions résultent probablement d'une hyperauxinie de l'hôte, phénomène mis en évidence dans bien des cas d'attaque fongique ou bactérienne (PEGG et SELMAN, 1959; SEQUEIRA et KELMAN, 1962; MATTA et GENTILE, 1964).

L'accumulation d'AIA peut être le résultat de processus différents (GRANITI et MATTA, 1968; DIMOND, 1970) :

- synthèse d'AIA par l'agent pathogène (MATTA, 1965; MACE, 1965).Selon MATTA, cependant, cette synthèse d'AIA par le champignon ne saurait contribuer que de façon minime à l'établissement de l'hyperauxinie dans la plante infectée.

- activation de la synthèse d'AIA par les tissus de l'hôte (MATTA et GENTILE, 1964, 1965, 1968).

- inhibition du processus de dégradation des auxines (SEQUEIRA et KELMAN, 1962; SEQUEIRA, 1963).

L'hyperauxinie peut donc se réaliser selon des mécanismes différents qui, d'ailleurs, ne s'excluent pas

Outre leur intervention au niveau des phénomènes de croissance, les hormones végétales ont un champ d'action très vaste dans la plante (THIMANN, 1963; CHAMPAGNAT, 1969). VOLKEN (1972) souligne qu'il existe une relation directe entre l'équilibre hormonal (entre auxines et gibberellines, notamment) dans un organe donné et l'état physiologique de cet organe; par des traitements à l'acide gibberellique et à l'AIA, il montre que, dans la tomate attaquée par le *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* ou atteinte par une souche du virus de la mosaïque aucuba, l'évolution des manifestations pathologiques est étroitement liée à cet équilibre auxines-gibberellines. D'ailleurs, des traitements avec diverses substances de croissance qui modifient le milieu dans lequel le parasite se développe et favorisent certaines réactions de défense de la plante, ont été expérimentés pour lutter contre les maladies vasculaires (DAVIS et DIMOND, 1953; CORDEN et DIMOND, 1959; MATTA, 1962; MOREAU, 1964).

B) APRES INTRODUCTION DE SPORES PAR ENTAILLE DE LA TIGE (Ite)

Les entailles sont pratiquées de 6 à 8 cm au-dessus du collet, c'est-à-dire dans la zone où, comme nous l'avons montré (cf. chap. III), des spores arrivent dans un délai très court après infection au niveau des racines et où la gommose devient particulièrement intense. Bien que très artificielle, cette technique nous paraît présenter les avantages suivants :

- on contrôle le moment où l'inoculum pénètre dans les vaisseaux.
- on retrouve aisément les spores inoculées car elles sont introduites en grand nombre dans un secteur limité du xylème.
- on peut ainsi suivre, dès les premiers stades de l'infection, le comportement du parasite et les réactions de l'hôte.

1 - Contrôle biologique de la pénétration et de la progression du *P. cinerescens* dans les tiges infectées

Ce contrôle a été effectué sur des oeillets "Coronation" âgés de 8 mois, hauts de 90 cm environ et fleuris.

a) Pénétration des spores

Vingt-quatre heures après inoculation, c'est-à-dire avant toute extension du champignon par croissance mycélienne (la germination de ses spores demande une vingtaine d'heures dans les meilleures conditions), sa présence dans la tige est contrôlée par mise en culture à partir de coupes sériées. Dans les 4 plants utilisés, il est retrouvé respectivement jusqu'à 15, 15, 18, 21 cm au-dessus de l'entaille.

Parallèlement, la longueur maximale des vaisseaux dans la zone intéressée est estimée par insufflation d'air : dans les 3 plants testés, elle est évaluée à 18, 20, 21 cm. Des spores du *P. cinerescens* sont donc véhiculées par le courant transpiratoire dans la tige de ces oeillets jusqu'à une hauteur équivalente à la longueur maximale des vaisseaux.

b) Progression du parasite dans la tige (tableau 18)

Tableau 18 : Progression du *P. cinerescens* dans la tige d'oeillets infectés expérimentalement (Ite) 6 à 8 cm au-dessus du sol

Nombre de jours après l'inoculation	Hauteur maximale (cm) atteinte par le parasite au-dessus du point d'inoculation, dans chacun des plants testés
1	15 - 15 - 18 - 21
4	18 - 20
5	23 - 26
10*	40 - 40
15	50 - 55
20	sommet de la tige

* Lors de l'extension brutale du parasite, on constate que sa répartition est discontinue dans les parties hautes de la tige.

La progression du champignon est déjà nette 5 jours après l'infection et il atteint le sommet de la tige en une vingtaine de jours. Au bout de trois semaines environ, se manifestent aussi les premiers symptômes foliaires qui évoluent brutalement. Pourtant, dès le 15e jour après l'infection, le *P. cinerescens* est mis en évidence dans les feuilles des 7 premiers noeuds surplombant l'entaille. Sa présence dans le limbe précède donc l'apparition des taches ou des flétrissements foliaires, ce qui confirme des observations antérieures.

2 - Examen microscopique des tissus infectés

Pour cette étude, des "Coronation" âgés de 8 mois, ainsi que des "Scania" âgés de 5 mois ont été utilisés.

a) Comportement du parasite

- 24 h après l'infection, on retrouve les spores noires du *P. cinerescens* dans le xylème. Elles sont très nombreuses dans les premiers centimètres au-dessus de la blessure et certains vaisseaux en sont complètement obstrués (fig. 30). Quand de tels bouchons de spores sont constitués, ils doivent réduire le flux dans les vaisseaux où ils se trouvent et empêcher que se poursuive aisément l'ascension d'un grand nombre de spores. Le nombre de vaisseaux ainsi occupés diminue rapidement et, à 5 cm au-dessus de l'entaille, ils sont rares. On peut voir aussi des spores isolées ou en petits groupes, parfois bloquées derrière une cloison transversale. Il est de plus en plus difficile d'en observer au microscope quand on s'éloigne de la zone d'inoculation et, si leur présence est révélée par mise en culture jusqu'à une vingtaine de centimètres de haut, elles y sont sûrement très peu nombreuses.

- C'est à peine plus de 24 heures après leur pénétration que les premières spores germées sont observées mais elles sont rares à ce moment. Par contre, elles sont très nombreuses après 3 ou 4 jours (fig. 31 A).

- A partir du 5e jour, on trouve facilement du mycélium dans les vaisseaux qui sont ensuite progressivement envahis. Les hyphes sont en général issues de conidies dispersées, les éléments vasculaires bourrés de spores ne sont jamais des foyers importants de leur développement.

- Vers le 10e jour, le mycélium est apte à sporuler : on trouve dans les vaisseaux de jeunes spores à paroi peu colorée et des phialides ont été observées (fig. 31 B). Transportées par le courant de sève, ces spores sont capables d'établir, à distance, des foyers secondaires d'infection, créant momentanément, dans la répartition du parasite, des discontinuités signalées au tableau 18.

- 20 jours après l'inoculation, le *P. cinerescens* atteint le sommet de la plante, son extension latérale y est facilitée par la structure du xylème qui, à ce niveau, devient peu épais avec des vaisseaux nombreux et rapprochés.

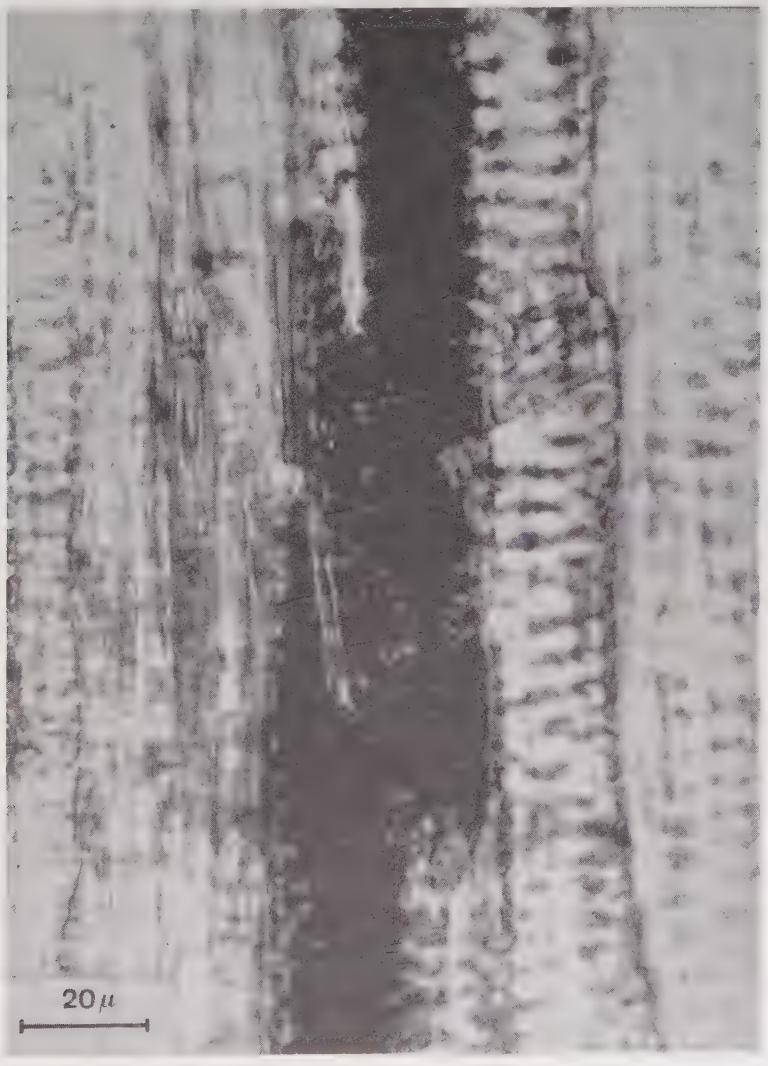


Fig. 30 : Coupe longitudinale du xylème d'une tige d'oeillet, un centimètre au-dessus de l'entaille infectieuse : l'un des vaisseaux est complètement obstrué par les spores du *P. cinerescens*.

Le mycélium se présente sous deux aspects : hyphes de fort calibre, à paroi épaisse et colorée ou bien hyphes hyalines plus grêles. Ces dernières ont souvent un tracé rectiligne, sont peu ramifiées et assurent probablement une progression rapide du parasite vers le haut de la tige.

Quand deux vaisseaux sont contigus, les hyphes passent facilement de l'un dans l'autre par les ponctuations (fig. 31 C) ce qui entraîne rapidement l'occupation des vaisseaux adjacents. Une hyphe grêle s'insinue dans la ponctuation, se renfle en un minuscule appressorium qui s'applique contre la mince paroi mitoyenne avant de la traverser. La pénétration du mycélium dans les autres éléments du tissu ligneux n'a pas été observée dans le délai de 3 semaines après l'infection.

Là où le xylème secondaire est bien développé, le mycélium occupe d'abord préférentiellement les vaisseaux proches du cambium ainsi que les vaisseaux primaires et les premiers vaisseaux secondaires formés, c'est-à-dire les bords externe et interne de l'anneau ligneux.

Conclusion

Introduit sous forme de conidies dans les vaisseaux de l'oeillet, le *P. cinerescens* s'y développe aussitôt et sa sporulation s'y réalise. Quand des vaisseaux sont adjacents, les hyphes passent de l'un à l'autre par les ponctuations : cela assure au parasite une certaine extension latérale dans le xylème mais elle reste limitée car les vaisseaux, isolés ou en petits groupes, sont séparés par un abondant parenchyme ligneux qu'il ne pénètre pas (au moins jusqu'à un stade très avancé de la maladie).

Cette localisation exclusive dans les vaisseaux n'est pas aussi stricte pour d'autres parasites vasculaires ; les bactéries en particulier tendent à envahir le parenchyme voisin où se créent des poches lysigènes (WOLF et NELSON, 1969; BUDDENHAGEN et KELMAN, 1964); l'invasion des cellules voisines des vaisseaux du chêne par le *Ceratocystis fagacearum* est décrite par SACHS *et al.* (1967); le *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* semble passer beaucoup plus facilement dans le parenchyme ligneux de l'oeillet que le *P. cinerescens* (PENNYPACKER et NELSON, 1972) avec formation de cavités. Pour le *C. ulmi*, le passage dans les cellules qui entourent les vaisseaux est encore discuté (POMERLEAU, 1970; KRAUSE et WILSON, 1972).

Quand le *P. cinerescens* se développe à partir de spores introduites par entaille dans la tige d'oeillet de moins d'un an, nous avons remarqué qu'il occupe rapidement les vaisseaux du xylème proches du cambium

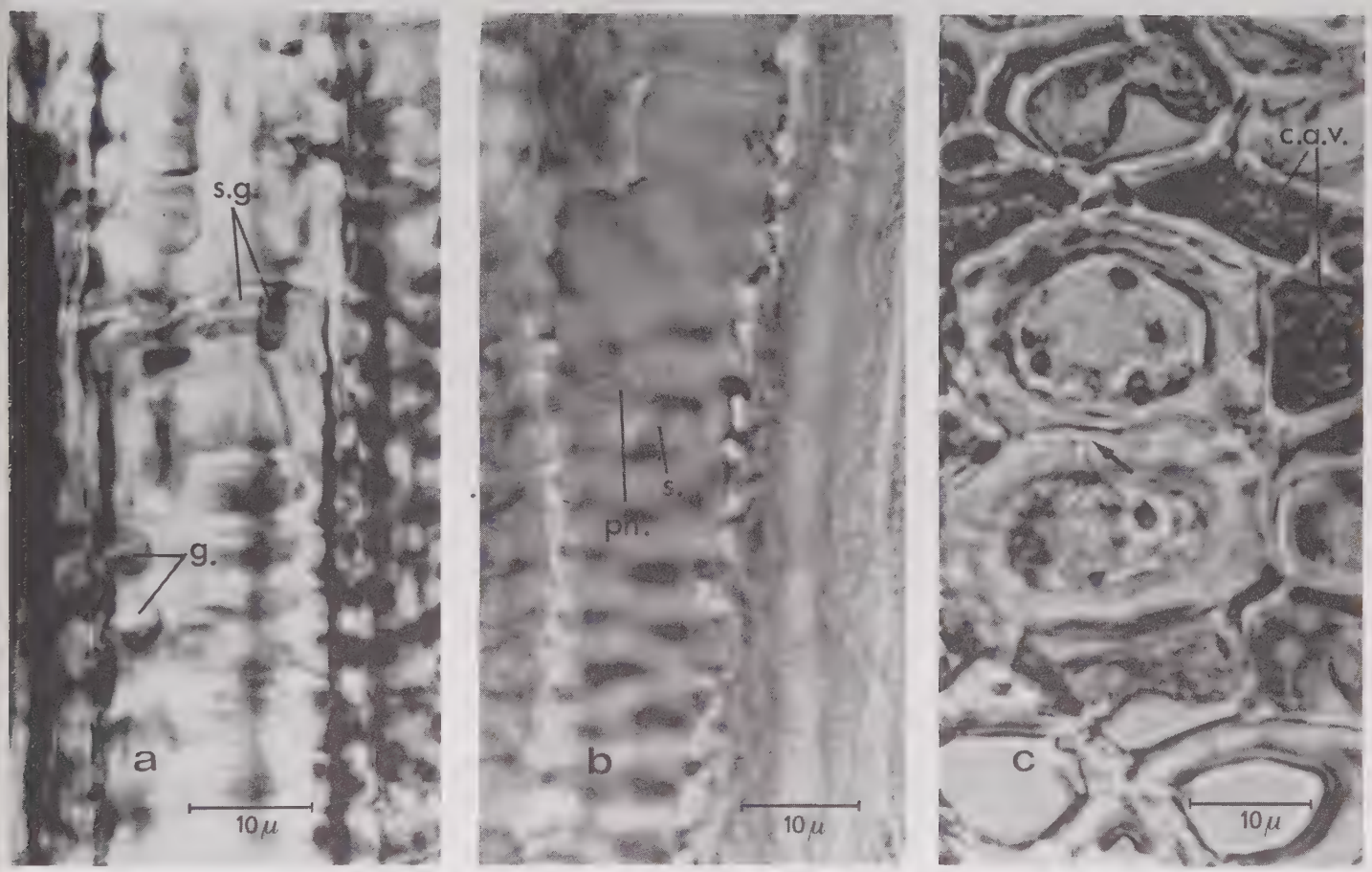


Fig. 31 : *P. cinerescens* dans le xylème d'oeillet infecté (Ite)

a : Coupe longitudinale, 4 jours après inoculation : quelques spores, arrêtées par une cloison entre 2 éléments d'un vaisseau, sont en germination (s.g.). Noter l'exsudation de gomme (g.) au travers des ponctuations.

b : Phialide (ph.) et spore (s.) dans un vaisseau (coupe longitudinale).

c : Coupe transversale : on peut observer le passage d'une hyphe (flèche) par une ponctuation entre 2 vaisseaux contigus. Noter l'aspect granuleux et fortement coloré au bleu coton des cellules associées aux vaisseaux (c.a.v.).

et ceux proches de la moelle. Quand des oeillets plus âgés sont infectés par les racines, c'est dans l'anneau de xylème le plus récent, dans les vaisseaux les plus proches du cambium où la sève circule activement qu'apparaît principalement la gommose. Or, étudiant par un procédé de marquage radioactif, le transport des assimilats dans les plantes, BONNEMAIN (1972) a montré que, chez les Solanacées, il y a migration de molécules organiques à partir du phloème vers la partie périphérique du xylème. Chez le radis, au moment de la mise à fleur, les réserves du tubercule sont retransportées vers la tige épicotylée et ce transfert se fait essentiellement par le xylème (FREDON et BONNEMAIN, 1973) : les molécules organiques marquées sont abondantes dans sa partie périphérique, notamment dans les parois en voie de lignification, et aussi dans la zone périmédullaire. En raison de transferts latéraux du phloème vers le xylème et de transferts verticaux des racines vers des récepteurs comme les fleurs, le *P. cinerescens* pourrait trouver dans la partie périphérique et périmédullaire du xylème, une solution nutritive plus riche favorisant son développement. La sève des vaisseaux ligneux ne contient jamais une forte concentration en sucres mais, du fait de la circulation, leur apport est constamment renouvelé.

La présence physique du parasite et les métabolites qu'il libère dans le courant transpiratoire provoquent des réactions de la plante-hôte. L'étude histologique des tissus infectés permet d'observer certaines d'entre elles.

b) Réactions de la plante

La réaction la plus visible de l'hôte à la présence du *P. cinerescens* est l'apparition d'une intense "gommose" brun-cannelle dans le xylème. Parallèlement à l'évolution de cette gommose, nous avons régulièrement suivi, au cours du processus infectieux, les modifications des parois vasculaires et les altérations visibles au sein du parenchyme ligneux.

α - Réactions des cellules vivantes du xylème

Le montage des coupes dans le bleu coton utilisé ici pour faciliter l'observation du champignon dans les tissus de l'hôte, nous permet de

noter, après 2 ou 3 jours, une intense coloration bleue du cytoplasme des cellules vivantes autour des vaisseaux infectés (notamment des cellules à paroi mince qui leur sont accolées, les c.a.v.). Avec la pyronine, les mêmes cellules présentent une coloration rose accentuée. Une modification de leur métabolisme et leur implication dans le processus pathologique sont ainsi décelées.

La coloration des coupes par l'hématoxyline de Regaud montre, dans ces cellules,des mitochondries nombreuses mais qui deviennent bientôt difficiles à distinguer car le cytoplasme se vésiculise et se charge d'une multitude de globules prenant la même teinte violette (les substances gommeuses qui s'accumulent dans les vaisseaux se colorent de la même façon). Le noyau reste longtemps reconnaissable mais on observe bientôt la dégénérescence et le brunissement des cellules parenchymateuses. Ce mode d'infection constitue une agression trop brutale et entraîne une invasion trop rapide pour que d'importantes formations péridermiques puissent se développer comme dans le cas d'infection par les racines. Cependant, quelques recloisonnements de cellules de la moelle s'ébauchent au contact du secteur infecté du xylème; le long des vaisseaux occupés par le parasite, les cellules associées ont parfois deux noyaux, la division cellulaire n'est pas terminée.

Nous avons cherché à détecter la présence éventuelle de phénols dans les tissus de l'oeillet. Les réactions utilisées ont toutes donné des résultats négatifs dans les plantes saines qui ne semblent pas contenir de phénols libres. Cependant, au niveau du xylème infecté, apparaît une légère coloration bleue avec le réactif de Folin-Ciocalteu et rouge avec la paranitraniline.

β - Modification de la paroi des vaisseaux

Entre deux vaisseaux sains dont la différenciation est achevée, la paroi primaire apparaît, après passage au V.M.P. ou à l'A.P.S., comme une ligne violacée au niveau des épaississements de lignine, tandis que, au niveau des ponctuations, elle est mince et ne se colore que très faiblement (fig. 32, A). Par contre, entre deux vaisseaux malades, la paroi primaire devient épaisse au niveau des ponctuations, violet foncé au V.M.P., rouge pourpre à l'A.P.S. ce qui révèle la présence de polysaccharides insolubles (fig. 32, B); elle se colore, en outre, au bleu coton, ce qui fait penser que de la callose pourrait s'y déposer.

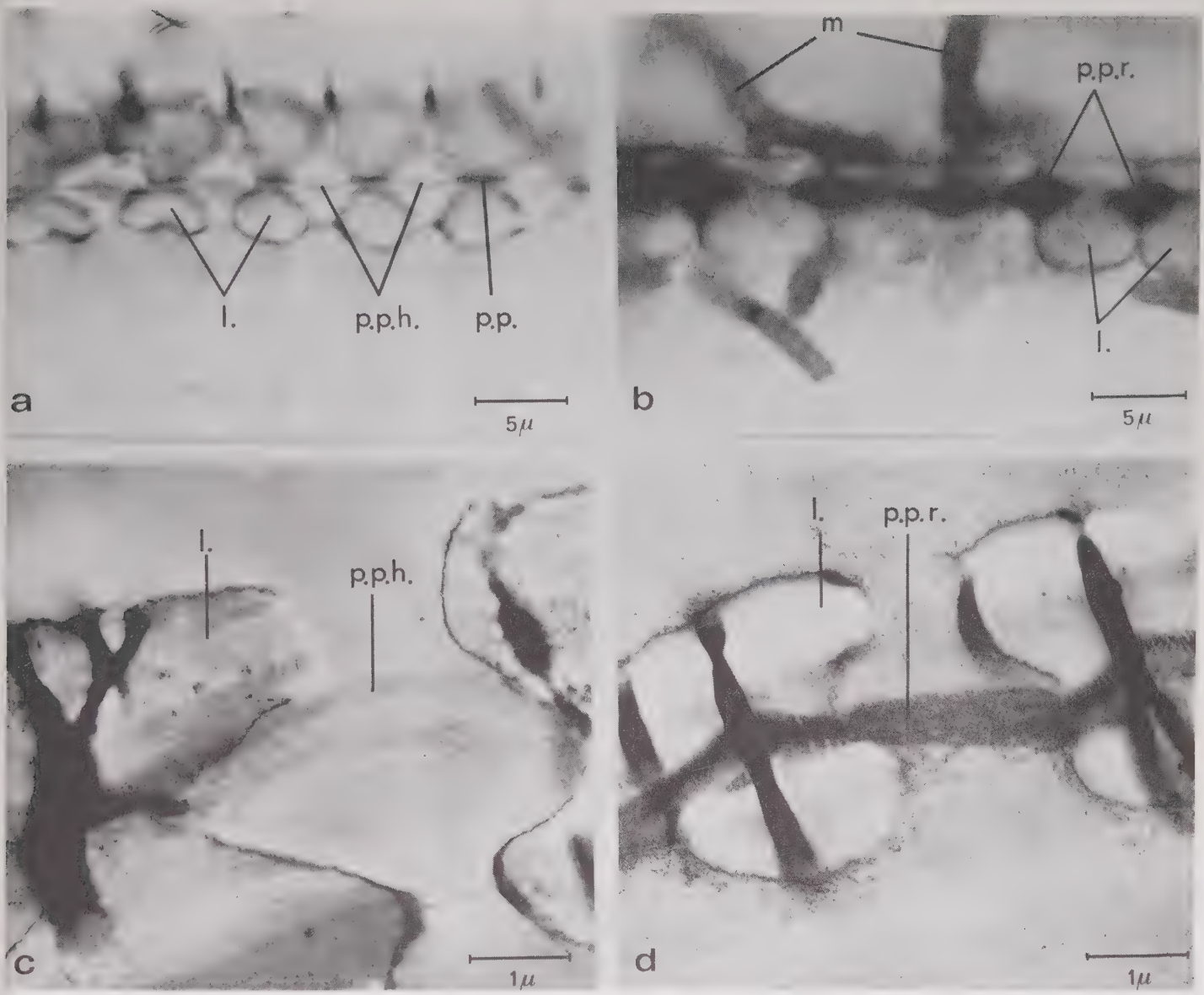


Fig. 32 : Comparaison des parois primaires entre vaisseaux adjacents sains ou infectés (a, b : microscopie photonique, coupes longitudinales traitées à l'A.P.S. - c, d : microscopie électronique, coupes longitudinales traitées par la technique de Thiéry).

a : Vaisseaux sains : au niveau de leurs épaississements lignifiés (l.), la paroi primaire (p.p.) est bien contrastée; elle apparaît mince et peu contrastée (p.p.h.) au niveau des ponctuations.

b : Vaisseaux infectés : au niveau des ponctuations, la paroi primaire s'est fortement épaissie (p.p.r.). m : mycélium du *P. cinerescens*.

c : Vaisseaux sains : la paroi primaire apparaît hydrolysée (p.p.h.) au niveau de la ponctuation.

d : Vaisseaux infectés : la paroi primaire apparaît renforcée (p.p.r.) au niveau de la ponctuation.

Dans les premiers centimètres au-dessus de l'entaille infectieuse, ces épaississements dans les ponctuations entre vaisseaux adjacents sont déjà observables 24 h après l'inoculation, au voisinage des bouchons de spores, mais la proximité de la blessure et l'introduction brutale d'une telle quantité d'inoculum constituent des conditions particulières. De tels renforcements ont aussi été recherchés 3 semaines après l'infection, à 45 cm au-dessus de l'entaille, là où le xylème a été progressivement colonisé par le champignon : parmi les nombreux vaisseaux occupés par le mycélium, quelques-uns seulement présentent ces épaississements. Si quelques vaisseaux hébergent le parasite depuis 8 ou 10 jours, ils n'ont pas tous été atteints en même temps par le *Phialophora*; on peut penser que ce sont les plus anciennement occupés qui possèdent ces modifications des parois et que leur apparition exige un délai de plusieurs jours après l'installation du mycélium.

γ - Evolution de la"gommose"

La "gommose" est une réaction localisée : elle n'apparaît qu'au voisinage des endroits où le parasite (spores ou mycélium) est présent. La réaction gommeuse est importante autour des bouchons de spores qui ont pénétré par la blessure et peut même s'étendre aux vaisseaux voisins. Au contraire, quelques spores dispersées, même si elles germent, ne provoquent, au départ, qu'une réaction plus faible : à leur voisinage font intrusion, par les ponctuations, des exsudats de substance amorphe entre lesquels les hyphes germinatives se faufilent; celles-ci peuvent en outre échapper à l'obstruction en gagnant un vaisseau contigu.

La formation de substances gommeuses n'est pas instantanée : 40 à 50 heures seulement après la pénétration des spores, la "gommose" commence à apparaître dans les vaisseaux infectés; elle s'accentue dans les jours suivants. Elle est totalement absente d'oeillets témoins, blessés de la même façon mais où l'eau stérile remplace la suspension de spores : elle est donc bien une conséquence de la pénétration du parasite.

Trois semaines après l'infection, 40 à 45 cm au-dessus de l'entaille, la "gommose" est encore très faible bien que le mycélium y soit abondant et ait gagné certains vaisseaux au moins, depuis 8 ou 10 jours : les bouchons gommeux s'édifient donc lentement.

Les "gommes" se présentent sous deux aspects distincts : celui d'une substance granuleuse d'abord incolore puis jaune-brun obstruant rapidement la lumière du vaisseau, ou celui d'un magma homogène exsudant au travers des ponctuations en grosses gouttes hémisphériques qui bientôt confluent. Celles-ci pourraient, à première vue, être prises pour des thylles, mais leur coloration très intense à l'A.P.S. et au V.M.P. notamment, l'absence de membrane cytoplasmique et leur confluence en masses volumineuses éliminent cette possibilité.

Dans tous les cas, ces "gommes" acquièrent par la suite une teinte brunâtre qui gagne les cellules voisines. Alors que les tissus lignifiés sains présentent, dans nos conditions d'observation en U.V. (cf. chap. I), une fluorescence naturelle bleue, les zones imprégnées de "gommes" développent une fluorescence d'un jaune brillant; on ne l'observe d'ailleurs que très peu de temps avant de déceler, en lumière blanche, un léger brunissement du tissu.

Une telle modification de la fluorescence du xylème est provoquée chez l'oeillet par d'autres parasites vasculaires (LEMATTRE, 1968) et elle se manifeste aussi chez d'autres plantes. Une technique d'indexage de boutures, utilisée par LEMATTRE et GROUET (1970) est basée sur son observation; le procédé permet l'élimination de la plupart des boutures infectées mais ne donne pas une sécurité absolue; il subsiste un faible pourcentage d'erreur que l'on peut attribuer au délai nécessaire à l'apparition du phénomène et à des discontinuités dans la répartition du parasite.

δ - Conclusion

Si les vaisseaux où se localise le *P. cinerescens* sont eux-mêmes des éléments inertes, vidés de cytoplasme, ils sont environnés par les cellules vivantes du parenchyme ligneux, susceptibles de réactions biologiques. Le métabolisme de ces cellules se montre, en effet, rapidement affecté par la présence du parasite dans les vaisseaux qu'elles entourent et on peut donc penser qu'elles jouent un rôle important dans le processus pathologique.

La présence du *P. cinerescens* dans le xylème entraîne l'apparition de substances gommeuses qui obstruent les vaisseaux. Le même phénomène

se manifeste sous l'action d'autres parasites vasculaires chez des plantes très diverses. Il est souvent accompagné de la formation de gels ou de thylles (BECKMAN, 1964; PERESSE, 1968) qui n'ont pas été observés chez l'oeillet.

SAALTINK et DIMOND (1964) constatent, chez la tomate atteinte de fusariose, que ces "gommes ne peuvent être dissoutes par des enzymes pectinolytiques bien qu'elles se colorent au rouge de ruthénium et qu'elles n'ont pas les caractères d'une lignine car elles disparaissent sous l'action du phénol et de l'acide chlorhydrique. Au contraire, dans l'orme attaqué par le *Ceratocystis ulmi*, d'après GAGNON (1967), les "gommes" développées dans les vaisseaux contiennent de la lignine et des substances pectiques. Chez l'oeillet, ces bouchons gommeux comportent une forte proportion de polysaccharides insolubles et semblent, en partie au moins, de nature pectique. MOREAU (1957) y caractérise des résines à acide résinolique, des tanins à acide ellagique. Leur composition est complexe, ce qui les rend difficiles à caractériser par des colorations spécifiques.

L'introduction directe de spores par une entaille, dans le xylème de la tige d'oeillet nous a permis de préciser que cette gommose ne se forme pas de façon instantanée, son développement exige un délai de plusieurs jours pendant lesquels l'avance du *Phialophora* se poursuit. De plus, elle ne se forme qu'au voisinage du parasite et son apparition à un niveau donné succède à l'installation du mycélium. Dans ces conditions, les bouchons gommeux ne peuvent constituer un obstacle physique à la progression du *P. cinerescens* car leur formation est trop tardive et trop localisée. Par contre,leur présence dans un vaisseau y bloque le courant transpiratoire et ils risquent donc d'aggraver le processus pathologique plutôt que d'améliorer la résistance de la plante.

Le brunissement du xylème accompagne typiquement l'infection vasculaire et se produit chez les végétaux sous l'action de divers facteurs microbiologiques ou physiologiques. Le processus de son apparition est discuté par RUBIN et ARTSIKHOVSKAYA (1964) . Cette coloration résulte de l'oxydation de phénols par des polyphénoloxydases, suivie d'une polymérisation de ces produits oxydés en pigments mélanoïdes.

Une augmentation de la teneur en substances phénoliques a été mise en évidence dans les tissus végétaux à la suite d'infection par des

champignons, des bactéries ou des virus (FARKAS et KIRALY, 1962; MATTA *et al.*, 1969, 1970). Les mécanismes pouvant aboutir à ce phénomène ont été envisagés par GRANITI et MATTA (1969) et la présence de phénols a été associée à la résistance des plantes aux agents pathogènes. Un accroissement de l'activité polyphénoloxydasique a aussi été constatée (FARKAS et KIRALY, 1962; MATTA et DIMOND, 1963). Si certaines plantes contiennent des phénols à l'état libre , ces substances se trouvent souvent dans les tissus végétaux à l'état combiné, sous forme de glucosides principalement, d'où elles peuvent être libérées par l'action des glucosidases du microorganisme pathogène, comme le suggèrent DAVIS *et al.* (1953) dans le cas de la fusariose de la tomate.

Dans l'oeillet sain, nous n'avons pas pu, par des méthodes histochimiques, mettre en évidence la présence de phénols à l'état libre. Cependant, le brunissement naturel des tissus, la réaction colorée diffuse obtenue avec le réactif de Folin-Ciocalteu et la paranitraniline au niveau du xylème infecté font penser que, des substances phénoliques sont impliquées dans les réactions de l'oeillet vis-à-vis du *P. cinerescens*.

II. CONTRIBUTION DE L'ANALYSE CHIMIQUE

Devant l'abondance des "gommes" qui se développent dans le xylème de l'oeillet atteint de verticilliose, on peut se demander quelle est la part du parasite ou de l'hôte dans leur élaboration. Avec la collaboration de Mademoiselle CHOLLET, du Laboratoire de Physiologie Végétale de la Faculté libre des Sciences de Lille, l'étude du métabolisme glucidique du parasite d'une part, et celle des tissus infectés d'autre part, ont été entreprises.

A) METABOLISME GLUCIDIQUE DU *P. CINERESCENS*

CHOLLET et MOREAU (1964) montrent que le métabolisme glucidique du *P. cinerescens* dépend des conditions de culture (température, volume de solution nutritive, nature et quantité de sucre fourni...). Apte, dans certains cas, à synthétiser une saponine et un pigment jaune, il peut aussi, à partir de saccharose, condenser des fructosanes, substances polyosidiques

amorphes; ce sont des matériaux de ce type qui constituent l'essentiel des gommes obstruant les vaisseaux des oeillets atteints de verticilliose.

CHOLLET, MOREAU M. et MOREAU C. (1965) mettent en évidence l'activité cellulolytique, amylolytique et gommolytique du *P. cinerescens* : celui-ci est capable de se développer et de sporuler sur les glucides de réserve (amidon, maltose, raffinose, fructose) et les glucides normalement présents dans les parois des végétaux ou leurs produits d'hydrolyse (cellulose, arabinose, xylose, galactose).

On peut donc se demander si les gommes qui obstruent les vaisseaux ligneux de l'oeillet sont synthétisées par le parasite à partir des substances glucidiques de son hôte. L'étude des glucides hydrosolubles ou non a donc été entreprise comparativement chez des oeillets sains et infectés expérimentalement, ainsi que l'analyse du xylème imprégné de gommes.

B) ANALYSE DES OEILLETS INFECTES

Il se manifeste des écarts importants entre la teneur en glucides des oeillets sains et infectés (MOREAU, CHOLLET et PERESSE, 1971), on constate notamment une chute de la teneur en glucides solubles totaux dans les racines et la basse tige en particulier et, d'une façon générale, une élévation du taux des hémicelluloses suivie de leur disparition progressive. Mais les résultats n'apportent aucune preuve évidente de la dégradation des parois (au moins au début du processus pathologique) dont les produits seraient susceptibles de constituer la gommose.

Une analyse plus précise des tissus gommeux a été effectuée en séparant le xylème des autres tissus et en n'utilisant que la portion de tige où la gommose est la plus visible (CHOLLET, MOREAU et PERESSE, 1971) dans les plants malades. On n'a constaté aucune variation de nature qualitative dans les matières pectiques et les hémicelluloses entre oeillets sains et oeillets infectés. La seule substance originale, associée à l'état pathologique n'est ni une gomme au sens chimique du terme, ni un composé pectique, ni un polyoside à base de fructose tel qu'en synthétise le *P. cinerescens* sur saccharose, mais c'est un hétéroside contenant du glucose et un aglycone indéterminé.

III. CONTRIBUTION DE LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

L'étude au microscope électronique du xylème d'oeillets sains et parasités que nous avons fournis, a été réalisée au Laboratoire de Botanique de l'Ecole Normale Supérieure à Paris par Melle CATESSON et Mme CZANINSKI dont les observations ont apporté de précieuses informations sur la structure de ce tissu et le comportement de ses éléments cellulaires au cours de la pathogénèse.

A) TECHNIQUES UTILISEES

Les fragments de tissus sont fixés par le glutaraldéhyde et postfixés par l'acide osmique. L'inclusion est faite dans l'araldite, les coupes sont examinées soit directement, soit après contraste par le permanganate de potassium ou par l'acétate d'uranyle.

Pour la mise en évidence des polysaccharides, les coupes sont traitées par la technique de THIERY (1967) : acide périodique, thiocarbohydrazide, protéinate d'Ag (PATAG).

Pour localiser l'activité peroxydasique, les coupes sont traitées par la diaminobenzidine et le peroxyde d'hydrogène avant la post-osmication (GRAHAM et KARNOVSKY, 1966).

B) OBSERVATION DU XYLEME D'OEILLET SAIN

1 - Ponctuations entre vaisseaux contigus

O'BRIEN et THIMANN (1967) et O'BRIEN (1970) signalent une hydrolyse de la paroi primaire au niveau des ponctuations entre vaisseaux contigus dans le xylème du coléoptile de Graminées et celui de la feuille de *Phaseolus vulgaris*. En 1972, CZANINSKI découvre le même phénomène dans le bois du robinier, du sycomore et CATESSON, CZANINSKI, PERESSE et MOREAU (1972) le signalent chez l'oeillet : à la fin de la différenciation des éléments vasculaires, les composés polysaccharidiques sont hydrolysés (réaction négative à la technique de THIERY) au niveau de ces ponctuations; la paroi primaire y persiste

cependant mais elle est peu nette et semble réduite à ses composants pectiques et protéiques comme le suggèrent sa coloration au rouge de ruthénium et ses qualités de contraste à l'acétate d'uranyle. Le parasite trouve donc là une zone de moindre résistance et les hyphes traversent aisément cette paroi affaiblie pour gagner le vaisseau adjacent.

2 - Cellules associées aux vaisseaux

CZANINSKI (1968), distingue dans le parenchyme ligneux du robinier, deux catégories cellulaires : d'une part, les cellules à rôle d'accumulation de réserves et d'autre part, des cellules contiguës aux vaisseaux et disposées en manchons autour d'eux. Celles-ci, qu'elle nomme "cellules associées aux vaisseaux" (c.a.v.) sont caractérisées par l'absence d'amidon, un chondriome abondant et ponctiforme, des vacuoles petites, de nombreux ribosomes et un reticulum endoplasmique développé. Leur aspect ne subit, en outre, aucune variation saisonnière.

Des cellules analogues, étroitement accolées aux vaisseaux, ont été retrouvées dans le xylème de l'oeillet (CZANINSKI, PERESSE, CATESSON et MOREAU, 1971) : leur cytoplasme riche en ribosomes, leurs mitochondries courtes, leurs plastes peu évolués suggèrent un métabolisme protéique actif. Leurs aptitudes physiologiques et leur situation privilégiée dans le cas d'un parasitisme vasculaire pouvant leur conférer un rôle important dans le processus pathologique, leur étude après infection par le *P. cinerescens* a été entreprise.

C) OBSERVATION DU XYLEME INFECTE

1 - Plantes infectées par les racines (CZANINSKI, PERESSE, CATESSON et MOREAU, 1971; CATESSON, CZANINSKI, PERESSE et MOREAU, 1972 a et b; CZANINSKI, CATESSON, MOREAU et PERESSE, 1973)

Des Oeillets Sim "Coronation" sont infectés 3 mois après bouturage selon le mode Ir. Du tissu ligneux est prélevé 2 mois après l'infection entre le 9e et le 12e noeud à partir de la base, c'est-à-dire dans la zone

où la gommose atteint son maximum d'intensité. Ces fragments de tissu sont fixés et traités par l'une des techniques précédemment citées.

a) Modifications apparaissant dans les vaisseaux

Le microscope électronique permet de détecter les composés gommeux dès le début de leur formation, quand ils sont encore en trop petite quantité pour être observables au microscope photonique. Ils apparaissent d'abord le long des parois des vaisseaux, en général au niveau des ponctuations où ils s'accumulent, gênant les transferts latéraux et ils finissent par occuper toute la lumière de ces conduits (fig.33 A et B). Ils ont une réaction positive avec l'osmium et l'argent. Ils se présentent sous des aspects variés : amorphes, granuleux ou finement fibrillaires.

Par endroits, la paroi interne des vaisseaux est tapissée d'une couche très fine d'épaisseur régulière dont la nature reste à déterminer (fig.33 B). Elle ne réagit pas avec le protéinate d'argent, elle n'est donc pas de nature polysaccharidique. Elle ne présente pas le même contraste que les ornementations lignifiées des vaisseaux, sa composition ne semble donc pas homologue de celle de ces ornementations.

Dans les ponctuations entre deux vaisseaux adjacents, la paroi est normalement très ténue car elle subit une hydrolyse en fin de différenciation (fig. 32 C). Après infection, elle s'épaissit fortement à cet endroit, entre deux vaisseaux gommeux (fig. 32 D). Ces épaississements sont bien contrastés par le permanganate de potassium, l'acétate d'uranyle et la technique de THIERY, mais de façon hétérogène dans ce dernier cas.

Les échantillons traités par le DAB et le peroxyde d'hydrogène montrent une nette activité peroxydasique dans les zones latérales de ces parois renforcées, la zone médiane en semblant presque dépourvue (fig. 34), ce qui confirme la nature hétérogène des épaississements pariétaux.

b) Modifications apparaissant dans les c.a.v.

Au voisinage des vaisseaux infectés, les c.a.v. manifestent une activité métabolique accrue : les mitochondries sont plus nombreuses et

s'allongent, les saccules du R.E. se dilatent, le plasmalemme devient très sinueux; des globules denses sont parfois visibles dans les saccules du R.E. et on en retrouve de semblables entre le plasmalemme et la paroi; il est possible que ces sécrétions participent à l'édification des bouchons gommeux dans les vaisseaux. Dans les vacuoles apparaissent des "profils" plus ou moins circulaires, fortement contrastés après traitement par le DAB et le peroxyde d'hydrogène.

Cependant, il semble que ces cellules puissent évoluer de 2 façons différentes. Les unes entrent rapidement en dégénérescence, se chargent de substances gommeuses, les organites cellulaires perdent leur individualité, mitochondries et noyaux restant les derniers reconnaissables.

D'autres, au contraire élaborent en abondance des composés pariétaux et gardent un aspect de cellules métaboliquement actives, avec un cytoplasme dense, des mitochondries nombreuses, des dictyosomes émettant de multiples vésicules riches en polysaccharides. Leur paroi adjacente à un vaisseau gommeux est épaissie intérieurement par une couche surnuméraire réagissant positivement à la technique de THIERY. Ces cellules tendent donc à s'isoler des vaisseaux malades en renforçant leur paroi (fig. 35). Certaines observations font penser que ce dépôt se fait d'abord au niveau des ponctuations, les épaississements se rejoignant ensuite. Le matériel qui remplit l'espace périplasmique au cours du processus a un aspect très hétérogène et comporte peut-être aussi des substances en transit vers la lumière des vaisseaux.

2 - Plantes infectées par une entaille de la tige (MOREAU, CZANINSKI, CATESSON et PERESSE, 1973)

Dix-huit jours après l'infection, des fragments de xylème sont prélevés au-dessus de l'entaille, dans l'entre-noeud immédiatement supérieur.

Les cellules vivantes du xylème, et notamment les c.a.v., manifestent des modifications analogues à celles déjà décrites ci-dessus, mais la brutalité de l'agression parasitaire provoquée par ce mode d'infection accélère et aggrave les symptômes. L'aspect du cytoplasme est profondément bouleversé et les figures obtenues sont parfois difficiles à interpréter :

certaines portions de cytoplasme se trouvent encerclées par les saccules dilatés du R.E. et une sorte de ségrégation cytoplasmique résulte de cet isolement. Le contenu vacuolaire est très hétérogène et il apparaît des "compartiments" dont la structure plus ou moins concentrique est révélée par la technique de THIERY.

Des composés divers sont synthétisés et secrétés avec une remarquable abondance. Dans les saccules dilatés du R.E. on voit des globules denses semblables à ceux qu'on trouve parfois en grand nombre dans l'espace périplasmique et dont le caractère de contraste aux électrons fait penser ã des polyphénols. Les dictyosomes nombreux et très actifs émettent de multiples vésicules contenant des polysaccharides; leur contenu peut se déverser à l'extérieur du plasmalemme ou bien elles confluent auparavant en poches volumineuses dont l'aspect rappelle celui des poches à mucilage de certaines plantes.

Cette activité aboutit à l'accumulation, dans le compartiment extracellulaire, d'une quantité considérable de matériel stratifié d'aspect variable, qu'on n'a pas observé avec cette abondance dans le cas d'infection par les racines.

En même temps, des gouttelettes apparaissent dans les vaisseaux au niveau des ponctuations communes avec les c.a.v. puis confluent et obstruent la lumière des trachées. Elles sont constituées d'une substance qui a, par endroits, un aspect identique à celui observé dans le compartiment extracellulaire (fig. 36), ce qui fait penser que celui-ci contribue probablement à l'élaboration de la gommose vasculaire.

D) CONCLUSION

Décelé au microscope optique, le rôle actif joué dans la pathogénèse par les cellules vivantes du parenchyme ligneux, par les c.a.v. notamment, est confirmé par cette étude ultrastructurale.

L'augmentation du nombre et de la taille des mitochondries pourrait être en rapport avec un accroissement de l'activité respiratoire, phénomène signalé dans divers cas d'infection vasculaire : chez la tomate atteinte de fusariose (COLLINS et SCHEFFER, 1958) et chez l'orme attaqué par le *Ceratocystis ulmi* (LANDIS et HART, 1968).

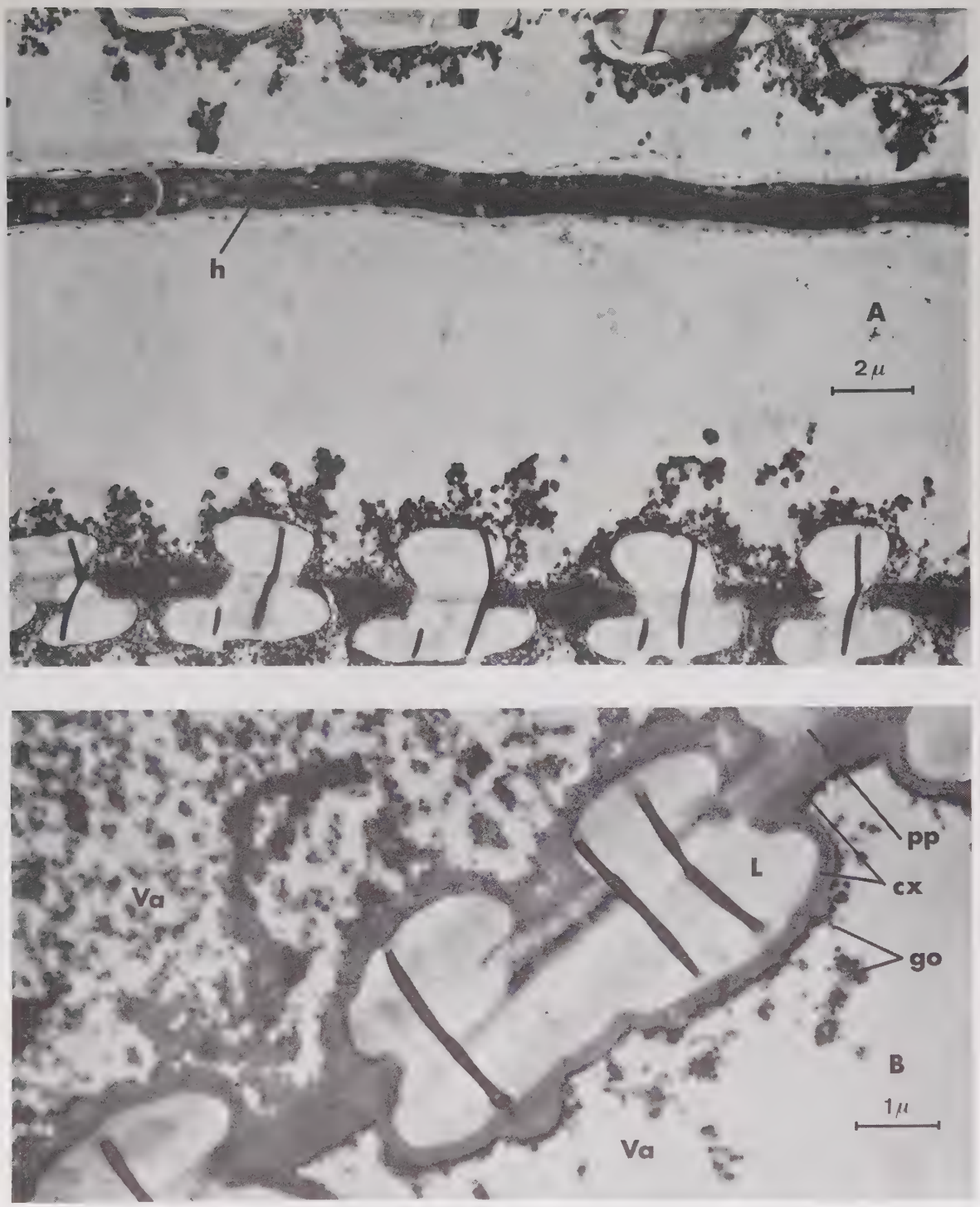


Fig. 32 : Vaisseaux d'oeillet infectés par le *P. cinerescens* (Oeillet "Coronation" 2 mois après l'infection (Irb_1), 10e entre-noeud, coupe longitudinale.

A : Fixation : glutaraldéhyde post-osmié. Contraste : MnO_4K. Noter, dans ce vaisseau, la présence d'une hyphe (h) et de dépôts de substances gommeuses.

B : Fixation : glutaraldéhyde post-osmié. Traitement : DAB en présence de H_2O_2.

Ces vaisseaux (va) sont remplis de " gommes" d'aspect granuleux (go). Dans l'un d'eux, la paroi primaire (pp) et les épaississements secondaires lignifiés (L) sont bordés par une couche continue de matériel dense (cx) dont la nature n'a pas été déterminée.

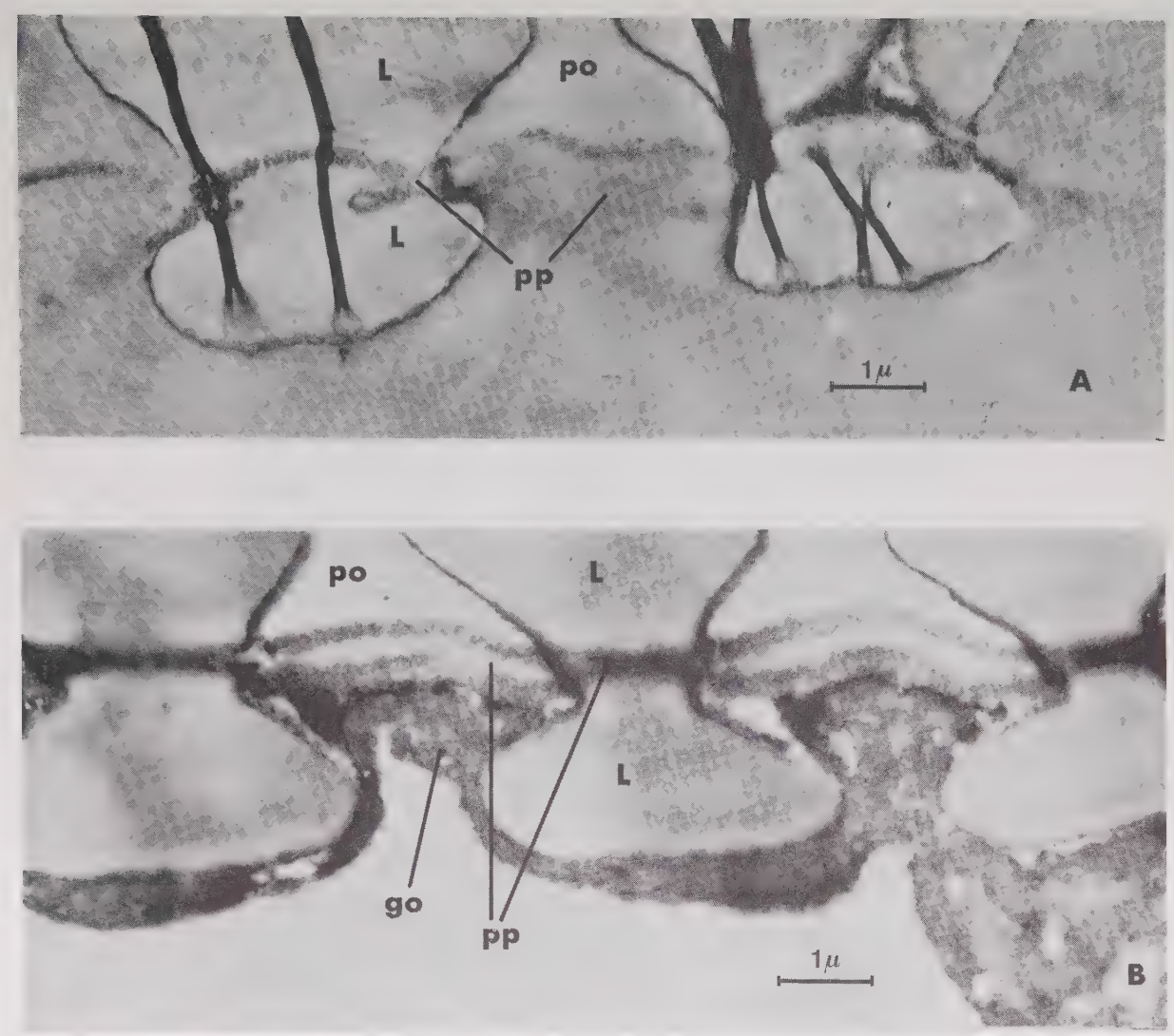


Fig. 34 : Activité peroxydasique dans les vaisseaux de l'oeillet.
(Oeillets "Coronation", 10e entre-noeud, coupes longitudinales.
Fixation : glutaraldéhyde post-osmié. Traitement : DAB en présence de H_2O_2).

po : ponctuation; pp : paroi primaire; L : paroi secondaire lignifiée; go : substances gommeuses.

A : Oeillet sain. On note une faible réaction positive sur la paroi primaire.

B : Oeillet infecté (Irb_1) depuis 2 mois : la paroi primaire séparant deux vaisseaux gommeux réagit au traitement.

Fig. 35 : Cellule associée et vaisseau dans le xylème d'oeillet infecté.

(Oeillet "Coronation", 2 mois après l'infection (Irb_1), 10e entre-noeud, coupes longitudinales. Fixation : glutaraldéhyde post-osmié. Contraste : MnO_4K).

va : vaisseau contenant des substances gommeuses; pe : plasmalemme; m : mitochondrie; v : vacuole.

Au contact du vaisseau, la cellule associée, au cytoplasme dense, montre des décollements du plasmalemme et des substances plus ou moins denses aux électrons s'accumulent dans l'espace periplasmique.

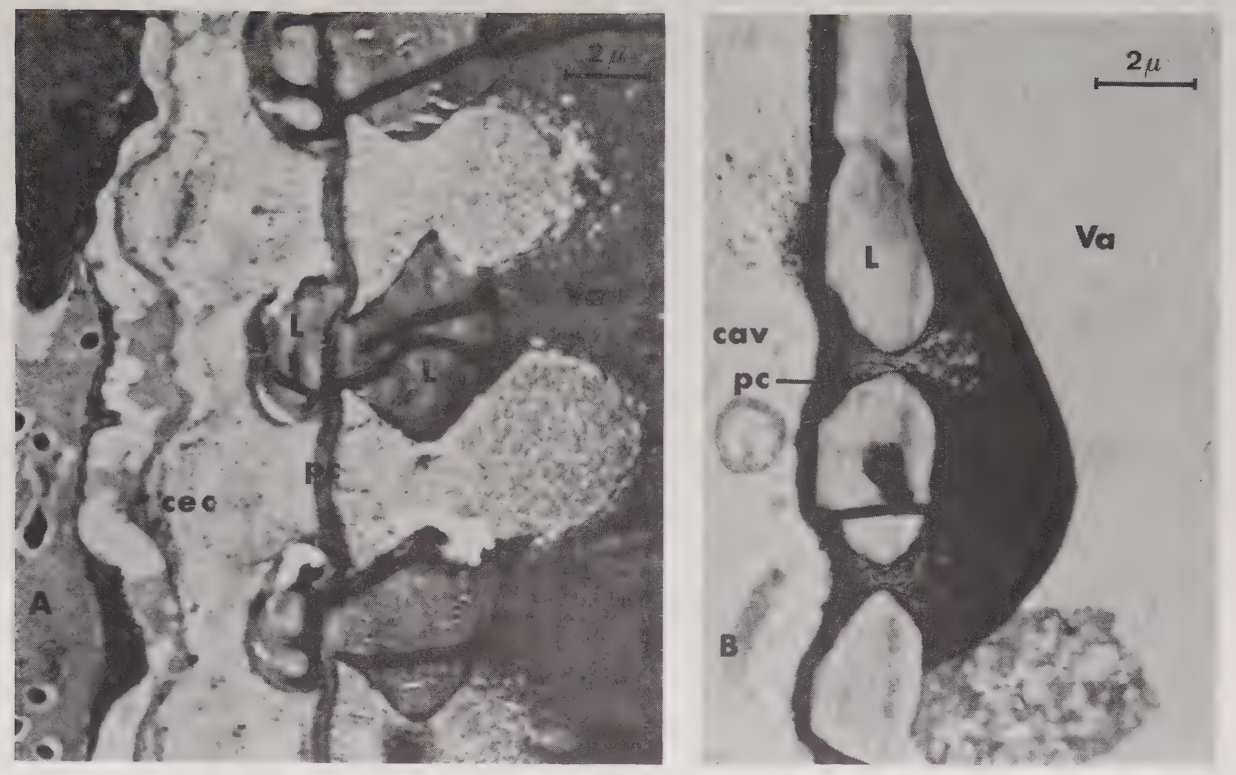


Fig. 36 : Paroi commune à une cellule associée et à un vaisseau dans le xylème d'oeillet infecté par le *P. cinerescens*.

(Oeillet "Scania", tige inoculée (Ite) depuis 18 j., coupes longitudinales dans l'entrenoeud immédiatement supérieur à celui de l'entaille infectieuse . Fixation : glutaraldéhyde post-osmié. Contraste : A, permanganate de potassium; B, technique de Thiery.)

c.a.v. : cellule associée au vaisseau. cec : compartiment extra-cellulaire L : épaississement secondaire lignifié. pc : paroi pecto-cellulosique. va : vaisseau.

A : Un matériel finement fibrillaire forme un dépôt abondant entre le plasmalemme et la paroi dans le compartiment extra-cellulaire de la cellule associée. Un matériel analogue se retrouve sous forme de gouttelettes dans la lumière du vaisseau.

B : Des gouttelettes très denses, très contrastées par l'argent, ont fusionné contre la paroi du vaisseau. Noter que d'autres gouttelettes, plus fibrillaires, semblent s'insinuer dans ce matériel dense, à partir des ponctuations.

L'activité peroxydasique est accrue; les modifications du métabolisme entraînent l'apparition de substances diverses dont une partie passe à l'extérieur du plasmalemme devenu très sinueux et participe à l'édification d'épaississements pariétaux et à la constitution de la gommose. Toutes ces formations tendent à isoler les éléments infectés des parties saines, à gêner l'extension latérale du parasite. Des modifications ultrastructurales tout à fait analogues ont été décrites par CATESSON, POMERLEAU et MOREAU (1974) dans le bois d'orme infecté par le *Ceratocystis ulmi*.

Beaucoup de parasites vasculaires produisent, *in vitro*, des enzymes pectolytiques et même cellulolytiques. C'est pourquoi il a été suggéré que, dans les plantes infectées, ces enzymes puissent dégrader les constituants pariétaux des tissus de l'hôte, les produits de leur hydrolyse s'accumulant dans la lumière des vaisseaux pour y former de véritables bouchons (SCHEFFER et WALKER, 1953; GOTHOSKAR *et al.*, 1953; WAGGONER et DIMOND, 1955; DEESE et STAHMANN, 1962). Cependant on n'a jamais pu obtenir de preuve irréfutable que les gommes prennent naissance par ce processus. Le rôle des enzymes pectiques dans les maladies vasculaires n'est pas bien établi et des résultats contradictoires sont énoncés : pour la verticilliose du coton, WIESE *et al.* (1970), KEEN et ERWIN (1971) affirment que ces enzymes ne sont pas impliqués dans la pathogénèse tandis que MUSSELL (1973) pour la même maladie, COOPER et WOOD (1973) pour la verticilliose de la tomate, apportent des arguments en faveur de leur action. Dans le cas de la verticilliose de l'oeillet, ni l'étude histopathologique au microscope photonique, ni les observations au microscope électronique, ni l'analyse chimique ne fournissent l'indication d'une hydrolyse des parois squelettiques sous l'action d'enzymes fongiques ou de la participation des produits d'une telle dégradation à l'édification de la gommose. Au contraire, toutes les modifications constatées vont dans le sens d'un renforcement des parois par dépôt de couches supplémentaires dont les matériaux sont élaborés par l'activité métabolique accrue des cellules du parenchyme xylémien, c'est-à-dire par l'hôte lui-même.

IV. CONTRIBUTION DE TRAVAUX DE PHYSIOLOGIE CONCERNANT LA CROISSANCE

La croissance d'une plante résulte à la fois de la multiplication et de l'allongement de ses cellules. Parmi les facteurs qui la régissent,

une place prépondérante revient, entre autres, aux phytohormones à noyau indolique dont la teneur est contrôlée, en permanence, par l'activité de systèmes enzymatiques qui assurent leur anabolisme (WIGHTMAN et COHEN, 1968; THIMANN et GROCHOWSKA, 1968) ou leur catabolisme (PILET, 1961; PILET et GASPAR, 1968; CHAPPET, 1972). En décrivant les symptômes de la verticilliose nous avons, à plusieurs reprises, signalé chez des oeillets infectés, des phénomènes relevant de la croissance, les uns dans le sens de son activation (hypertrophie, hyperplasie), mais d'autres dans le sens de son inhibition (taille réduite et courbure du sommet des tiges). Les premiers ont été observés dans de nombreux cas d'attaque vasculaire; ils relèveraient d'une hyperauxinie (cf. p. 132).

La réduction de croissance et la courbure du sommet des tiges, signalées chez les oeillets atteints de verticilliose, se manifestent dans des plants où la discrétion de l'attaque à ce moment nous empêche d'attribuer un rôle prépondérant à des facteurs nutritionnels (cf. chap. III). La courbure est induite à distance par le parasite, l'allongement de la tige et le développement des feuilles sont réduits du côté de l'attaque ce qui pourrait procéder d'une hypoauxinie.

De nombreux travaux (PILET, 1961; PILET et GASPAR, 1968; DUBOUCHET, 1968; CHAPPET, 1972; PUGIN, 1973) ont montré qu'une croissance réduite est le plus souvent associée à une forte activité auxines-oxydasique et à une intense activité peroxydasique globale. Dans divers cas d'attaque fongique, une augmentation de l'activité peroxydasique globale des plantes atteintes a été signalée : après infection de la patate douce par le *Ceratocystis fimbriata* (KAWASHIMA et URITANI, 1963) ou le *Phytophthora infestans* (TOMIYAMA et STAHMAN, 1964), et aussi après infection du melon (MARAITE, 1970) ou de la tomate (GRZELINSKA, 1970; GENTILE et MATTA, 1973) par le *Fusarium oxysporum*. On peut donc se demander si le *P. cinerescens* est capable d'agir sur l'activité enzymatique et l'équilibre hormonal de l'oeillet pour y causer les altérations de croissance observées. Nous avons eu la chance de voir s'intéresser à ce problème le Laboratoire de Physiologie Végétale de la Faculté des Sciences de Besançon, dirigé par Monsieur DUBOUCHET. Nous résumerons ici les résultats obtenus par cette équipe de chercheurs à laquelle le Laboratoire de Biologie Végétale de la Faculté des Sciences de Brest a fourni le matériel dont la préparation relève plus spécialement de la myco-

logie et de la pathologie : mycélium lyophilisé, compartiment extra-cellulaire lyophilisé ou non, provenant de cultures du champignon effectuées dans différentes conditions; oeillets de plusieurs variétés, sains ou infectés expérimentalement.

Il était en premier lieu intéressant de vérifier si le *P. cinerescens* est capable de dégrader l'AIA : quelles que soient les conditions de l'expérience, l'extrait de mycélium ne dégrade pas l'AIA (DUBOUCHET, MOREAU, MOROT-GAUDRY et PUGIN, 1971); il ne contient pas d'isoperoxydase (DUBOUCHET, MOREAU, CHAPPET et MOROT-GAUDRY, 1971); il en est de même pour le filtrat de culture (PUGIN, 1973). L'altération de croissance des oeillets ne peut donc être attribuée à l'action directe, au sein de l'hôte, de systèmes auxines-oxydasiques propres au parasite. Par contre, l'extrait de mycélium ou de filtrat de culture est capable de renforcer l'activité AIA-oxydasique (essais *in vitro*) d'un extrait de racines de lentille et de réduire l'inactivation (effet de protection) que subissent les peroxydases d'un tel extrait pendant une incubation de 30, 60, 120 minutes à 25° C. (PUGIN, DUBOUCHET, GRISON et MOREAU, 1974). Cet effet de protection est lié à la présence, dans le filtrat de culture, de deux groupes de composés hydrosolubles, à caractère protéinique : le complexe I de masse moléculaire supérieure à 30 000 et inférieure à 150 000, le complexe II de masse moléculaire inférieure à 5 000 (PUGIN, DUBOUCHET, ROUSSET et MOREAU, 1974). *In vitro*, ces complexes ralentissent l'inactivation des peroxydases d'un extrait de racines de lentille; *in vivo*, seul le complexe II est capable de freiner l'allongement de la racine de lentille. Ce ralentissement est associé à une augmentation importante de l'activité peroxydasique globale (PUGIN, DUBOUCHET et GUIGNARD, 1974).

Le *P. cinerescens* est-il capable, quand il se développe en parasite dans l'oeillet, de moduler les activités AIA-oxydasique et peroxydasique de son hôte comme il le fait pour celles de la lentille, grâce aux substances qu'il rejette dans son milieu de culture? GRISON (1972) montre que l'activité peroxydasique globale est répartie dans la tige de l'oeillet selon un gradient un peu différent d'un cultivar à l'autre, mais elle est toujours plus élevée dans les parties physiologiquement âgées. Elle procède, dans la variété "Scania" par exemple, de 6 isoperoxydases (GRISON, 1974): à pH 5,8 une est anodique (A_1), une est neutre (N), quatre sont cathodiques (C_1, C_2, C'_3, C_3), C_3 étant la plus basique. Dans les plantes infectées, elle

devient beaucoup plus intense (GRISON, DUBOUCHET, GALLOIS, PERESSE, 1974); ce résultat confirme donc des observations faites au microscope électronique (CATESSON, CZANINSKI, PERESSE, MOREAU, 1972). Cet accroissement qui s'accompagne d'une augmentation de la teneur en protéines est d'autant plus grand que les symptômes sont plus graves et est relativement plus important au niveau des entre-noeuds courts, c'est-à-dire dans la partie de la tige où le parasite prend le plus d'extension (cf. chapitre II). Ces perturbations suggèrent une accélération de la sénescence des tissus parasités.

L'infection ne provoque l'apparition d'aucune nouvelle isoperoxydase mais GRISON (1974) précise que le gradient d'activité des 6 isoperoxydases de la plante n'est pas uniformément modifié. Ainsi, l'augmentation relative d'activité pour A_1 (peroxydase acide, à pH 5,8) et pour C_3 (la plus basique,peut-être susceptible de posséder une activité'AIA-oxydasique) est maximale dans la partie supérieure de la tige, même dans le cas de symptômes légers, ce qui suggère la possibilité d'une action à distance du parasite.

Les travaux de GRISON (1974) semblent indiquer qu' une ou plusieurs substances du complexe II mis en évidence dans les filtrats de culture du *P. cinerescens* et actif *in vivo* sur la croissance de la racine de lentille, sont probablement présentes dans les tissus de l'oeillet infecté. Si cela est confirmé, il reste à savoir dans quelle mesure ces substances sont responsables de l'augmentation de l'activité peroxydasique des plantes malades, quelle est leur nature, quels sont les mécanismes de leur action et leurs conséquences dans le processus pathologique, compte tenu des interactions complexes dont la plante est le siège.

V. TENTATIVE D'APPROCHE DES MECANISMES DE RESISTANCE CHEZ L'OEILLET

Si le *P. cinerescens* provoque chez l'oeillet d'importantes réactions dont nous avons pu décrire quelques aspects, celles-ci sont, de toute évidence, insuffisantes pour arrêter le développement de ce champignon qui envahit progressivement toute la plante. L'oeillet sait cependant s'opposer à l'invasion par d'autres parasites vasculaires : nous avons, précédemment, montré sa résistance vis-à-vis du *V. dahliae* pourtant très polyphage et qui semble même plus apte que le *P. cinerescens* à progresser rapidement dans le xylème d'une plante-hôte (cf. chap. IV). Après infection d'oeillets, réalisée

parallèlement avec le *P. cinerescens* ou le *V. dahliae* ou bien avec les deux espèces en mélange, nous avons comparé le comportement de ces deux champignons dans les tissus et les réactions de la plante à leur contact, pour tenter d'approcher les mécanismes de résistance mis en jeu.

A) ETUDE COMPAREE DU XYLEME DE TIGES D'OEILLETS INOCULEES AVEC DES SPORES DE *V. DAHLIAE* OU DE *P. CINERESCENS* (PERESSE, 1973)

Des oeillets "Scania" âgés de 5 mois, sont inoculés, selon le mode Ite, avec une suspension de spores (15.10^6/ml) de *V. dahliae* ou de *P. cinerescens*.

1 - Comportement des deux champignons dans le xylème

a) Ascension des spores dans les vaisseaux

La longueur maximale des vaisseaux au-dessus de l'entaille est estimée par insufflation d'air. Vingt-quatre heures après l'infection par le *V. dahliae* ou le *P. cinerescens*, la répartition des spores dans la tige est précisée par mise en culture de coupes sériées prélevées au-dessus de l'entaille infectieuse. Les résultats obtenus sont les suivants :

longueur maximale des vaisseaux de la tige au dessus de l'entaille : de 11 à 15 cm

hauteur atteinte par les spores de *V. dahliae* dans les 3 plants testés : 11 - 8 - 7 cm

hauteur atteinte par les spores du *P. cinerescens* dans les 3 plants testés : 8 - 7 - 9 cm

Le courant transpiratoire véhicule donc les conidies des deux champignons à des hauteurs équivalentes, un peu inférieures à la longueur maximale des vaisseaux dans cette zone.

b) Localisation dans la période qui suit l'infection

La progression éventuelle des deux champignons est suivie dans les jours qui succèdent à l'infection, par mise en culture de coupes sériées de la tige au-dessus de l'entaille; elle est représentée fig. 37. On note que la progression du *Phialophora* est déjà nette au bout de 4 ou 5 jours et qu'il atteint le sommet de la tige en une vingtaine de jours. Quant au *Verticillium* on continue à l'isoler de la zone dans laquelle ses spores ont été directement introduites, mais on n'a jamais décelé sa progression verticale; au contraire, il marque bientôt une certaine régression; au bout de 2 ou 3 mois on ne l'isole plus qu'au voisinage de l'entaille infectieuse et les plantes inoculées ne présentent aucun symptôme pathologique.

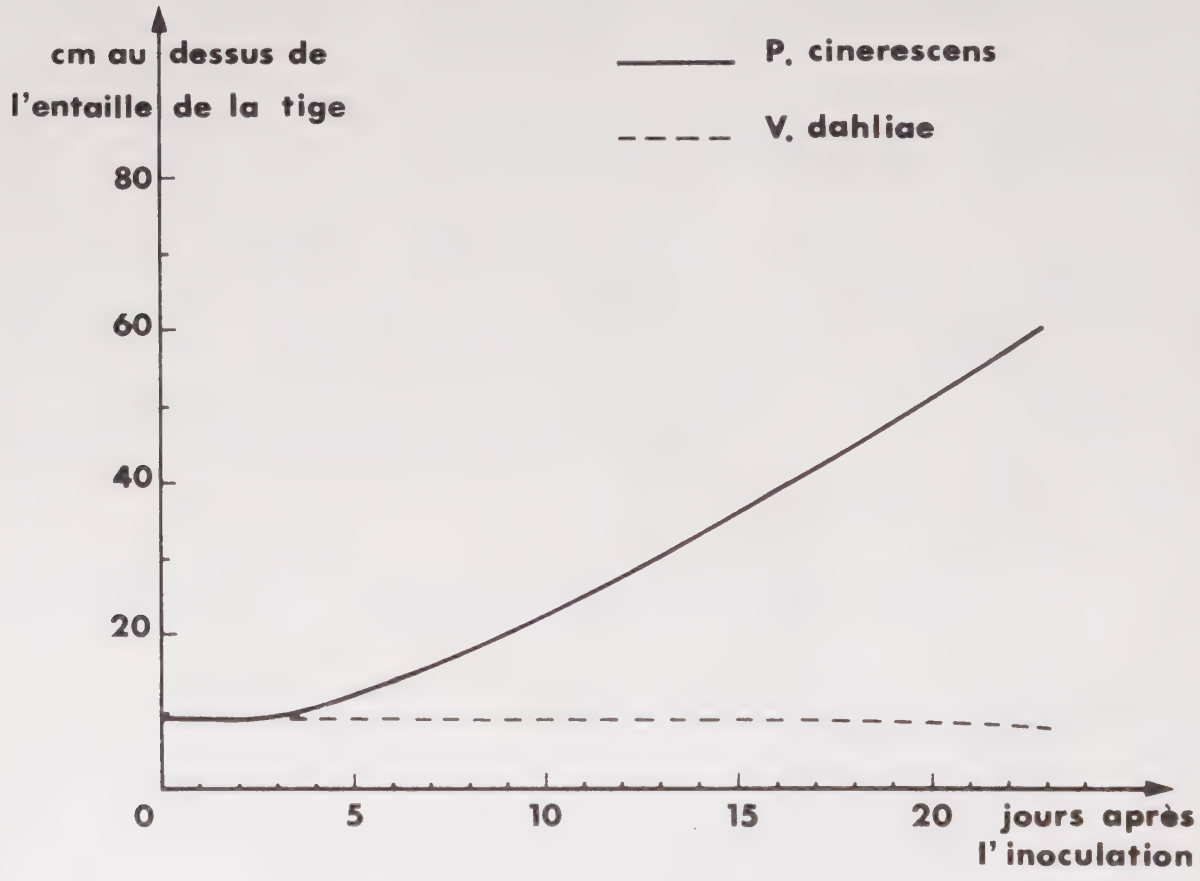


Fig. 37 : Localisation du *V. dahliae* et du *P. cinerescens* après introduction d'une suspension de spores par une entaille de la tige.

c) Examen microscopique du xylème infecté

Des coupes longitudinales sont pratiquées dans les 5 premiers centimètres au-dessus de l'entaille les 2e et 6e jours après l'infection. Après coloration au bleu coton,on y retrouve aisément les spores de *V. dahliae* ou de *P. cinerescens* qui ont pénétré en grand nombre dans les vaisseaux. Cependant, si les spores de *Phialophora* commencent à germer dès le 2e jour, produisant bientôt un abondant mycélium, nous n'avons jamais pu observer la germination des spores du *Verticillium*, même au bout de 6 jours.

L'absence de tout développement mycélien de la part du *V. dahliae* justifie sa localisation stagnante à la suite de l'introduction de spores dans le xylème par une entaille de la tige. Les spores restent viables pourtant (une partie d'entre elles au moins) pendant plusieurs semaines puisqu'on peut réaliser la mise en culture du champignon à partir de coupes de la tige qui les contiennent.

2 - Modification du xylème de l'oeillet infecté

L'observation microscopique d'un très grand nombre de coupes longitudinales et transversales montre que la présence,dans les vaisseaux,des conidies du *V. dahliae* provoque, dans le xylème, les mêmes réactions cytologiques que celles dues au *P. cinerescens* : gommose, épaississement de la paroi des ponctuations entre deux vaisseaux adjacents, altération du métabolisme des cellules associées, tendance de ces cellules à se rediviser se manifestent de la même façon; si ces réactions ne se généralisent pas puisque l'infection ne progresse pas, elles se produisent au départ avec une localisation, une intensité et des délais équivalents.

Si le *Verticillium* tentait de se développer, ces formations seraient donc, comme pour le *Phialophora* (à plus forte raison même, car il croît et sporule plus rapidement), inefficaces pour entraver sa progression car elles sont trop localisées et trop tardives. Elles n'ont d'ailleurs pas lieu d'exercer ce rôle puisque les spores du *Verticillium* ne germent pas du tout. Elles relèvent d'un processus de cicatrisation qui finira par isoler

et sceller les spores du champignon, là où elles s'étaient introduites, dans des nodules gommeux tout à fait analogues à ceux qui se forment au talon des boutures en réaction à la pénétration de microorganismes variés.

3 - Conclusion

La résistance de l'oeillet au *V. dahliae* ne semble donc pas due à l'édification précoce de barrières physiques empêchant sa progression, mais à des facteurs inhibant sa germination.

Les vaisseaux d'une plante constituent un habitat très particulier pour les microorganismes qui y accèdent : ceux-ci se trouvent placés dans des conduits capillaires, plongés dans un milieu liquide circulant qui est une solution nutritive très diluée, où la teneur en oxygène est réduite (DIMOND, 1962), le pH généralement acide (BENNETT *et al.*, 1927; BECKMAN, 1969) et beaucoup d'espèces ne peuvent s'y développer. Mais nous savons que le *V. dahliae* s'y adapte aisément chez des plantes très diverses car ses hôtes reconnus sont nombreux et appartiennent à des groupes systématiques variés.

Nous constatons aussi qu'il se développe couramment à la surface des coupes de tige d'oeillet dans nos boîtes de culture. D'autre part, nous avons vérifié que ses conidies germent sans inconvénient dans de la sève d'oeillet recueillie par centrifugation de tronçons de tige. Les facteurs inhibant la germination des spores du *V. dahliae* dans le xylème ne semblent donc pas préexister dans les vaisseaux de l'oeillet.

L'inhibition serait plutôt due à une réaction de l'hôte induite par la présence du parasite dans le xylème. La nature du facteur mis en cause reste à déterminer, mais on peut faire quelques remarques :

- la germination des spores du *V. dahliae* s'effectuant normalement en quelques heures (6 h environ), ce facteur doit être très rapidement mis en jeu et acquérir une efficacité quasi immédiate.

- les vaisseaux du xylème où sont introduites les conidies sont des éléments vidés de tout cytoplasme, une réaction biologique de l'hôte ne peut provenir que des cellules vivantes du xylème, des cellules associées aux vaisseaux notamment. Le champignon en est séparé par une paroi squelettique,

ce qui implique le transfert d'une information jusqu'au cytoplasme des cellules voisines puis le passage, en sens inverse, des facteurs de l'inhibition ainsi que d'autres produits de réaction, processus au cours desquels métabolisme et perméabilité cellulaire se trouvent concernés.

Lorsque ce sont des spores du *P. cinerescens* qui sont introduites dans le xylème, elles provoquent aussi, dans ce tissu, une réaction dont les manifestations histologiques ressemblent à celles dues au *V. dahliae*, mais la germination des conidies a lieu, le processus pathologique est enclenché et l'invasion se généralise. On peut alors envisager deux possibilités :

- ou bien le *Phialophora* provoque, de la part de l'oeillet, une réaction semblable à celle causée par le *Verticillium* mais il n'y est pas sensible ou est capable de détruire les facteurs d'inhibition qui lui sont opposés.

- ou bien le *Phialophora*, à la différence du *Verticillium*, ne cause pas chez l'oeillet une irritation suffisante pour déclencher cette réaction, la déclenche trop tard ou trop faiblement.

B) ESSAIS D'INFECTION CROISEE

Nous avons constaté le comportement différent du *P. cinerescens* et du *V. dahliae* dans les tissus ligneux de l'oeillet. On peut se demander si l'introduction de conidies de ces deux champignons en mélange pouvait modifier cette situation. Considérant les possibilités énoncées ci-dessus, on peut en effet envisager les cas suivants :

- Si ces deux parasites provoquent le même processus réactionnel de l'hôte mais que seul le *Phialophora* y est insensible, on ne constatera probablement aucune modification de leur comportement respectif.

- Si seul le *V. dahliae* suscite une réaction fongistatique de la part de l'hôte, elle pourrait être suffisante pour inhiber la germination du *P. cinerescens* introduit en même temps que lui.

- Si le *P. cinerescens* provoque, de la part de l'hôte, une réaction semblable à celle due au *V. dahliae* mais qu'il est capable de détruire les

facteurs d'inhibition mis en jeu, le *Verticillium*, bénéficiant de cette action, pourrait en profiter pour se développer en même temps que le *Phialophora*.

1 - Conditions expérimentales

a) Essais préliminaires

- Nous avons déjà vérifié que les conidies du *V. dahliae* introduites dans le xylème par une entaille de la tige se répartissaient dans les vaisseaux comme celles du *P. cinerescens*.

- Nous nous sommes assurée que, mises à germer ensemble, ces deux espèces ne se gênent pas : nous avons placé en goutte pendante, dans une solution de maltéa à 1 % des conidies des deux champignons en mélange. Dans les délais qui leur sont propres, les deux sortes de spores ont germé normalement.

- Afin de contrôler l'extension des deux champignons dans les jours qui suivent l'infection, nous avons, à nouveau, utilisé la méthode de mise en culture à partir de coupes sériées. On pouvait craindre cependant que l'une des espèces, moins compétitive, ne passe inaperçue dans nos boîtes de culture. C'est pourquoi, pour chaque plant testé, une coupe sur deux est déposée sur milieu de malt à la tomate et incubée à 11° C ce qui favorise la mise en évidence du *Phialophora;* une coupe sur deux est déposée sur milieu de malt à 2 % et incubée à 22° C, ce qui favorise le développement du *Verticillium*.

b) Mise en place de l'essai

- 3 lots de 15 oeillets "Scania", âgés de 5 mois sont constitués.

- Les tiges sont infectées par la méthode Ite. L'un des lots est infecté avec le *P. cinerescens* seul, le deuxième avec le *V. dahliae* seul, le troisième avec un mélange, en parties égales, de conidies de ces deux espèces.

- La localisation des champignons dans les tiges est précisée le 1er, le 6e et le 13e jour après l'infection. Les délais d'apparition des symptômes foliaires sont notés.

2 - Résultats

Les oeillets inoculés avec le *V. dahliae* seul ne manifestent pas de symptômes pathologiques et le champignon n'y accomplit aucune progression au-delà de la zone de pénétration passive des spores (tableau 19) car celles-ci ne germent pas. Par contre, inoculé seul ou en mélange avec le *V. dahliae*, le *P. cinerescens* se développe (tableau 19) et les taches foliaires apparaissent dans les deux cas au bout de 10 à 12 jours. Cependant, l'évolution des symptômes est un peu plus lente, dans l'ensemble, quand le *Verticillium* a été introduit en même temps que le *Phialophora* dans les vaisseaux.

Tableau 19 : Progression des champignons dans des tiges d'oeillets inoculées (Ite) par le *P. cinerescens*, le *V. dahliae* ou les deux en mélange (3 plants sont utilisés à chaque contrôle).

jours après l'infection	Hauteur (cm) atteinte au-dessus de l'entaille infectieuse par les champignons inoculés			
	P. cinerescens	*P. cinerescens* + *V. dahliae*		*V. dahliae*
1	8 - 6,5 - 9	7 - 9 - 6	7 - 8 - 5,5	11 - 8 - 7
6	15,5 - 16,5 - 21	9,5 - 18,5 - 14,5	3 - 3 - 4,5	6 - 6,5 - 6
13	35 - 30 - 27	28 - 40 - 32	4,5 - 7 - 4,5	0 - 3 - 0

3 - Conclusions

Dans nos conditions expérimentales, les conidies du *V. dahliae*, introduites dans le xylème de l'oeillet n'entrent pas en germination; elles n'y germent pas davantage en présence du *P. cinerescens*. Celui-ci ne semble

donc pas détruire les principes inhibiteurs de la germination du *Verticillium* ou le fait à un degré insuffisant pour autoriser son développement.

La présence du *V. dahliae* n'empêche pas non plus le *P. cinerescens*, introduit en même temps que lui, d'envahir le système vasculaire de son hôte. Les facteurs d'inhibition qu'il susciterait chez l'oeillet, seraient donc, dans ces conditions, inefficaces vis-à-vis du *Phialophora*. Puisqu'elles se trouvent ensemble dans les vaisseaux, les deux espèces fongiques sont plongées au sein d'un même milieu mais elles ne se comportent pas de la même façon, ce qui traduit leur sensibilité différente à l'un au moins des éléments (préexistants ou induits) qui le composent.

VI. CONCLUSIONS

La présence du *P. cinerescens* dans les vaisseaux où il se développe et sporule, provoque, dans le xylème de l'oeillet, d'importantes réactions. Elles ont, pour la plupart, leur siège dans les cellules vivantes du parenchyme ligneux dont le métabolisme est rapidement et gravement affecté. L'activité secrétoire des cellules associées aux vaisseaux est intense, une partie des substances élaborées passe dans le compartiment extracellulaire et participe à la constitution d'une abondante gommose et à l'édification de renforcements pariétaux des vaisseaux et des c.a.v. De telles formations sont susceptibles de s'opposer à l'extension du *P. cinerescens* mais les délais nécessaires à leur réalisation et leur localisation à proximité du parasite seulement, ne leur permettent pas d'arrêter la progression du champignon dans la plante.

Outre le mycélium et les spores du *P. cinerescens*, les grosses molécules libérées dans le courant transpiratoire et qui obstruent les pores minuscules des ponctuations, les épaississements pariétaux et la formation de bouchons gommeux dans les vaisseaux contribuent à réduire le flux de sève dans le xylème (DIMOND, 1967, 1970). Si la perte fonctionnelle d'une partie des vaisseaux de la tige y est, dans une certaine mesure compensée par le jeu des transferts latéraux, ses conséquences sont beaucoup plus graves au niveau des feuilles où chaque nervure ne comporte que quelques vaisseaux et est isolée au sein du parenchyme foliaire. Le déficit hydrique du secteur correspondant du limbe peut justifier le flétrissement et l'apparition des taches foliaires.

L'équilibre hormonal de la plante est perturbé comme en témoignent des phénomènes relevant de la croissance. Nous avons, dans certains cas, signalé une réduction de la taille et une courbure du sommet de la tige des oeillets infectés par le *P. cinerescens* : ces manifestations se produisent à distance du parasite et affectent des tissus méristématiques, aptes à exprimer rapidement une modification de leur état auxinique endogène Elles pourraient donc être l'expression des tout premiers stades de l'interaction hôte-parasite à leur niveau. Par contre, dans le cas d'une hyperplasie du parenchyme ligneux, le phénomène affecte des tissus âgés, bien différenciés, ayant normalement terminé leur croissance, donc peu aptes à exprimer rapidement une modification de leur teneur en phytohormones. Il se produit à proximité du parasite, alors que celui-ci a atteint depuis un certain délai le niveau concerné. Il pourrait donc être l'expression d'un stade avancé de l'interaction hôte-parasite impliquant toutes les conséquences secondaires des graves perturbations du métabolisme de l'oeillet.

Bien que le *P. cinerescens* ne possède pas d'isoperoxydases, un accroissement considérable de l'activité peroxydasique globale se produit dans les plantes infectées ainsi qu'une augmentation de la teneur en protéines. Deux des isoperoxydases de l'oeillet semblent plus probablement concernées par une action à distance du parasite mais il reste à préciser leur mécanisme d'action et leur rôle biologique. Il serait intéressant de savoir dans quelle mesure ces enzymes sont impliqués dans l'activité auxines-oxydasique de l'oeillet et dans les processus qui sont à l'origine de la perte d'extensibilité des parois, ce qui pourrait justifier la courbure apicale et la réduction de croissance que présentent, dans certaines conditions, les oeillets infectés.

Comme dans beaucoup de cas d'attaque parasitaire, des polyphénols et des polyphénoloxydases sont mis en jeu dans les réactions de l'oeillet vis-à-vis du *P. cinerescens*. Ces substances sont susceptibles d'intervenir dans de nombreux processus physiologiques (FARKAS et KIRALY, 1962; KOSUGE, 1969) et leur portée sur l'évolution pathologique est considérable.

Les interactions hôte-parasite se traduisent finalement par l'apparition des symptômes pathologiques. Leur étude, dans le cas de la verticilliose de l'oeillet nous conduit à adopter le point de vue soutenu par ALLEN (1966) : si le parasite est incontestablement à l'origine des perturbations du métabolisme de l'hôte (par un mécanisme initial dont on sait

peu de choses), les symptômes sont dûs, en grande partie, à l'activité que la plante déploie en réponse à l'infection et expriment davantage les potentialités de l'hôte que celles du parasite.

L'introduction, dans les vaisseaux, de conidies du *V. dahliae* (autre parasite vasculaire auquel l'oeillet est résistant) provoque chez cette plante une même série de réactions peu spécifiques, ni plus intenses, ni plus rapides que celles dues au *P. cinerescens* introduit dans les mêmes conditions. Pas plus qu'elles n'arrêtent ce parasite de l'oeillet, elles ne peuvent donc faire obstacle à la progression éventuelle du *V. dahliae*. Par contre, le fait que les conidies du *V. dahliae* ne germent pas dans les vaisseaux de l'oeillet nous semble plus significatif. Certains indices font penser que les facteurs de cette inhibition ne préexistent pas dans la plante (ou y sont en quantité insuffisante) mais se forment après l'inoculation des conidies dans le xylème. Des essais d'infection croisée montrent que le *V. dahliae* présente, à leur égard, une plus grande sensibilité que le *P. cinerescens*.

Il serait souhaitable de rechercher si des substances du type inhibitines, post-inhibitines ou phytoalexines (INGHAM, 1973) apparaissent dans le xylème de l'oeillet après introduction d'espèces pathogènes ou non; on pourrait se demander si le *P. cinerescens* est pathogène parce qu'il n'est pas affecté par leur présence ou sait les détruire, ou bien parce qu'il ne déclenche pas les réactions responsables de leur formation, le fait trop faiblement ou trop tardivement.

En raison de la rapidité avec laquelle certains facteurs semblent intervenir, envisager l'existence de réactions au niveau des parois, dans la phase la plus précoce de l'interaction hôte-parasite, ne serait peut-être pas à exclure.

CONCLUSIONS GENERALES

La verticilliose de l'oeillet causée par le *Phialophora cinerescens* constitue une trachéomycose typique mais dont nous avons, au moyen d'infections expérimentales, mis en évidence des traits originaux quant à la spécificité notamment.

Pour que s'établisse la relation parasitaire, le champignon doit d'abord atteindre le système vasculaire de la plante puis être capable de s'y développer et de l'envahir progressivement.

MODES D'ACCES DU *P. CINERESCENS* AUX VAISSEAUX DE L'OEILLET

Nous avons montré que deux processus différents peuvent intervenir :

- pénétration active : le mycélium traverse les assises corticales des radicelles et atteint le xylème malgré l'édification par la plante, en réponse à l'infection , notamment au niveau de l'endoderme, de formations pariétales comme les "lignitubers". Dans ce cas, le parasite joue un rôle actif, mais le processus exige un certain délai pour se réaliser.

L'entrée en germination, sous l'action des exsudats racinaires de l'oeillet, des conidies de *P. cinerescens* placées dans sa rhizosphère, augmente considérablement les chances de contact du champignon avec son hôte et les risques d'infection par cette voie.

- pénétration passive : au niveau de blessures (naturelles ou provoquées) des racines, les petites myxospores du parasite peuvent s'introduire dans les vaisseaux brisés puis, dans les limites autorisées par la longueur de ces conduits, y être entraînées à distance par le courant de sève, parfois jusque dans la tige. Bien que le champignon n'y joue qu'un rôle passif, ce processus assure, en un très court délai, la présence de propagules infectieuses au sein même du tissu où le parasite se développe normalement.

PROGRESSION DU PARASITE DANS LA PLANTE ET SYMPTOMES PATHOLOGIQUES

Bien que, dans nos conditions expérimentales d'infection au niveau des racines, des spores atteignent couramment la basse tige de l'oeillet moins de 48 h. après l'apport de l'inoculum dans le substrat, cette verticilliose n'est jamais une affection à évolution rapide. Le parasite semble s'installer difficilement dans le xylème de son hôte, son développement y est d'abord très lent, sa progression imperceptible; cela correspond à une période d'incubation longue de plusieurs semaines à plusieurs mois, pendant laquelle sa présence dans la plante reste insoupçonnée.

Puis sa progression s'accélère peu à peu. Il est entré dans sa phase d'extension depuis plusieurs semaines et a atteint la hauteur du 10e au 13e noeud quand les premiers symptômes externes se manifestent. L'invasion se généralise rapidement, d'autant mieux que des conidies sont entraînées à distance dans les vaisseaux, par le courant transpiratoire. L'état pathologique ne se révèle donc que très tardivement, quand la maladie entre dans sa phase finale; et que le parasite occupe déjà une grande partie du xylème.

L'étude de la localisation du champignon au moment où apparaissent les différents symptômes fait ressortir que la gommose du xylème et les taches foliaires sont étroitement liées à la présence du *P. cinerescens*; ils ne sont pas induits à distance par le parasite mais succèdent au contraire à son installation. Par contre, la courbure apicale qui peut se manifester dans le cas d'infection précoce des oeillets, se produit à une certaine distance du mycélium et résulte probablement d'un processus différent. Cette observation est à l'origine de travaux de physiologie pour tenter d'en comprendre le mécanisme.

INFLUENCE DE DIVERS FACTEURS SUR L'EVOLUTION DE LA MALADIE

Si l'aspect des symptômes semble assez constant quelles que soient les conditions expérimentales, leur délai d'apparition et leur vitesse d'évolution varient car les relations hôte-parasite sont soumises à un ensemble complexe de facteurs dont nous avons tenté de séparer les rôles.

- les variétés d'oeillet sont sensibles à des degrés divers au *P. cinerescens* (les cv. américains, dans l'ensemble, paraissent l'être encore plus que les cv. méditerranéens) mais aucune ne semble totalement résistante.

- les souches de *P. cinerescens* sont plus ou moins virulentes mais on n'en connaît aucune de non pathogène pour l'oeillet. En outre, elles conservent ce pouvoir pathogène de façon stable, même en culture prolongée sur milieu synthétique.

- l'oeillet est particulièrement réceptif quand sa croissance végétative est vigoureuse et rapide. Tous les facteurs qui favorisent le développement de la plante (âge, amélioration de la nutrition azotée, des conditions de température et d'éclairement etc...) causent une apparition plus précoce et une aggravation des symptômes de la maladie. Les conditions qui pourraient en ralentir l'évolution sont donc en général incompatibles avec un développement satisfaisant de l'oeillet.

- les facteurs susceptibles de favoriser la pénétration du *P. cinerescens* dans la plante-hôte et de multiplier les points d'infection comme les blessures des racines ou l'augmentation de la densité de l'inoculum dans le sol, provoquent aussi une accélération et une aggravation du processus pathologique.

Cette étude aide à comprendre les fluctuations de la maladie dans les cultures d'oeillets mais fait aussi prendre conscience de la difficulté de la lutte contre cet agent pathogène dont la présence et le développement au sein même du cylindre central restent longtemps ignorés. Des fongicides endothérapiques comme le bénomyl ont donné de bons résultats par leur action fongistatique sur le parasite dans les tissus de son hôte; mais l'apparition de souches insensibles à leur action et les conséquences des perturbations de l'équilibre biologique dans les sols traités leur font perdre de leur intérêt.

Agir en renforçant les défenses naturelles de la plante constituerait sans doute une solution de choix. L'oeillet en effet, n'est pas un substrat inerte pour le champignon dont la présence provoque d'importantes réactions de défense dans les tissus de son hôte.

REACTIONS DANS LE XYLEME D'OEILLET INFECTE PAR LE *P. CINERESCENS*

Nous avons pu souligner le rôle essentiel que jouent, dans les réactions pathologiques de l'oeillet, les cellules vivantes du parenchyme ligneux (les cellules associées aux vaisseaux notamment), rôle que les vaisseaux eux-mêmes, vidés de tout cytoplasme, ne peuvent assumer.

Il se produit une modification très rapide du métabolisme des c.a.v. : les unes entrent rapidement en dégénérescence mais d'autres prennent l'aspect de cellules métaboliquement actives; divers produits de sécrétion passent à l'extérieur du plasmalemme.

L'une des réactions les plus visibles de l'hôte à la présence du *P. cinerescens* est le développement d'une intense gommose brun cannelle dans le xylème. Ces "gommes" de composition complexe, ne semblent pas provenir de l'hydrolyse des parois cellulaires de la plante par des enzymes fongiques; toutes les modifications constatées vont au contraire dans le sens d'un renforcement de ces parois dont les matériaux sont élaborés, comme les gommes elles-mêmes, par l'activité métabolique accrue des cellules du parenchyme xylémien c'est-à-dire par l'hôte. Les gommes obstruent les vaisseaux mais elles se forment de façon trop localisée et trop lente pour y constituer un obstacle à la progression du champignon. Par contre, elles gênent ou interrompent le courant transpiratoire et risquent d'aggraver le processus pathologique plutôt que d'améliorer la résistance de la plante.

Bien que des phénols à l'état libre n'aient pu être mis en évidence dans les oeillets sains, plusieurs observations font penser que de telles substances et des polyphénoloxydases sont impliquées dans les réactions de la plante à l'infection.

Certains symptômes relèvent d'une modification de l'équilibre hormonal chez l'hôte. Il peut se produire une hypertrophie et un recloisonnement des cellules voisines des éléments infectés, réalisant parfois leur complet encerclement. Une croissance réduite du côté le plus atteint cause une

courbure du sommet de la tige; le phénomène est lié à une augmentation importante de l'activité peroxydasique de l'oeillet dont pourraient être responsables certaines substances excrétées par le *P. cinerescens*.

La plupart de ces réactions tendent à entraver l'extension du parasite mais elles sont, de toute évidence, insuffisantes pour arrêter la progression du *P. cinerescens*. Finalement, elles contribuent davantage à l'expression des symptômes qu'à la résistance vis-à-vis de l'agent pathogène. En outre, elles ne semblent pas spécifiques de la verticilliose de l'oeillet; des manifestations analogues se produisent chez des plantes diverses en présence de nombreux microorganismes et aussi à la suite de traumatismes variés.

INFLUENCE RECIPROQUE DU PARASITE ET DE L'HOTE DANS LA SPECIFICITE

Le *P. cinerescens* manifeste une spécificité parasitaire relativement étroite que nous avons précisée : il ne semble pathogène que pour quelques Caryophyllacées appartenant toutes à la sous-famille des Silénoïdées. Nous n'avons pas pu, pour le moment, déterminer quelle particularité confère à ce groupe systématique une telle sensibilité.

Au cours d'essais pratiqués sur des plantules cultivées *in vitro*, le *P. cinerescens* s'est montré capable d'envahir les racines et d'atteindre la partie inférieure de la tige d'autres Caryophyllacées et même d'une Solanacée comme la tomate, sans que ces plantes présentent jamais de symptômes pathologiques. Leur résistance ne réside donc pas au niveau de la pénétration dans les racines mais se manifeste au sein même du xylème. Si le phénomène se produit aussi dans les conditions normales de culture au champ, ces espèces pourraient contribuer, avec les Caryophyllacées sensibles, au maintien d'un inoculum pathogène dans le sol.

Au cours de son développement, l'oeillet est confronté avec des microorganismes très variés, non seulement au niveau de son rhizoplan mais aussi au coeur même de ses tissus que des propagules peuvent atteindre en s'introduisant par des blessures dans les vaisseaux rompus. Nous avons montré la réalité de ce type de pénétration et comparé le comportement de plusieurs champignons à cet égard. Pourtant, peu d'entre eux sont capables, comme le *P. cinerescens* de nuire à la plante qui manifeste donc une sensibilité spécifique. Si certaines espèces ne peuvent s'adapter aux conditions très particulières rencontrées dans les vaisseaux, il est plus étonnant que

d'autres, parasites vasculaires reconnus de plantes variées, ne puissent s'y développer. Le problème de la spécificité parasitaire se pose donc avec toute son acuité.

Pour tenter de cerner les facteurs déterminant l'arrêt du processus pathologique ou, au contraire, autorisant son développement, nous avons retenu comme modèle d'étude, la confrontation de l'oeillet avec, d'une part, le *Phialophora cinerescens*, parasite vasculaire de spécificité parasitaire étroite mais auquel il est très sensible et, d'autre part, le *Verticillium dahliae*, parasite vasculaire très polyphage vis-à-vis duquel il se montre résistant.

Inoculé avec des conidies de l'un ou l'autre de ces deux champignons, le xylème des tiges d'oeillets manifeste des réactions analogues (activation du métabolisme des cellules associées aux vaisseaux, gommose, renforcement des parois, redivisions cellulaires); puisqu'elles se produisent, au départ, avec une localisation, une intensité et des délais équivalents, nous ne pouvons pas attribuer le blocage du *V. dahliae* dans la zone inoculée à l'édification plus rapide qu'en présence du *P. cinerescens*, d'obstacles physiques entravant sa progression. Ils n'auraient d'ailleurs pas lieu d'exercer ce rôle car les spores du *Verticillium* ne germent pas. Dans nos conditions expérimentales, la résistance de l'oeillet au *V. dahliae* semble donc due à des facteurs inhibant la germination des conidies de ce champignon dans les vaisseaux. Les facteurs de cette inhibition paraîssent se former par réaction de l'hôte en réponse à l'infection et doivent apparaître de façon très rapide dans les cellules vivantes du xylème, les cellules associées aux vaisseaux en premier lieu.

L'introduction, dans les vaisseaux d'une tige d'oeillet, de conidies de *P. cinerescens* et de *V. dahliae* en mélange, ne modifie pas de façon notable leur comportement respectif mais montre bien, puisqu'elles se trouvent alors ensemble au sein d'un même milieu, qu'elles sont affectées de façon différente par certains de ses constituants.

Des recherches sur le plan biochimique devront être entreprises pour tenter de déterminer la nature et le mode d'action des facteurs mis en

jeu, notamment dans la phase précoce de l'interaction entre la plante et le champignon car, dans certains cas au moins, elle semble décisive pour que s'établisse ou non la relation parasitaire.

R E S U M E

Le *Phialophora cinerescens* (Wr.) van Beyma cause chez l'oeillet (*Dianthus caryophyllus L.*) une grave trachéomycose dont les manifestations ont été précisées au cours d'infections expérimentales au niveau des racines. L'évolution de cette maladie est influencée par différents facteurs concernant l'hôte, le parasite et leur environnement; le rôle de certains d'entre eux est apprécié. Tous ceux qui favorisent une croissance vigoureuse de la plante (âge, amélioration de la nutrition azotée, des conditions de température et d'éclairement...) ou la pénétration du parasite (blessures des racines, accroissement de la densité de l'inoculum dans le sol), causent une accélération du processus pathologique.

Le parasite peut accéder aux vaisseaux de son hôte par 2 voies différentes :

- pénétration "active" : par développement du mycélium à travers les assises corticales des radicelles dont les exsudats induisent la germination des conidies placées dans la rhizosphère.

- pénétration "passive" : par introduction de conidies dans des vaisseaux brisés, au niveau de blessures de la partie souterraine du plant; ces spores sont entraînées dans le xylème par le courant ascendant de sève, parfois jusqu'à la partie basale de la tige où le parasite peut être mis en évidence après un très bref délai (moins de 48 h).

La progression du *P. cinerescens* est suivie au cours des différentes étapes de la maladie et, notamment, pendant l'incubation (toujours longue de plusieurs semaines à plusieurs mois en dépit de la pénétration précoce de conidies jusque dans la tige). L'état pathologique ne se révèle que très tardivement quand le parasite occupe déjà une grande partie de la plante.

La localisation du champignon au moment où apparaissent les différents symptômes fait ressortir que la gommose du xylème et les taches foliaires succèdent à son installation à un niveau donné; par contre, une courbure apicale de la tige peut se manifester à distance du mycélium parasite.

La spécificité parasitaire du *P. cinerescens* est précisée : outre les espèces du g. *Dianthus*, ce champignon attaque d'autres Caryophyllacées appartenant toutes à la sous-famille des Silénoïdées, la plupart à la tribu des Dianthées. Ces plantes sensibles peuvent assurer, en l'absence d'oeillets, le maintien du *P. cinerescens* dans le sol; mais d'autres espèces qui ne manifestent pas de symptômes pathologiques peuvent aussi assurer ce rôle car le parasite pénètre dans leurs racines et atteint la base de leur tige.

La présence du *P. cinerescens* provoque, dans les tissus de l'oeillet, d'importantes réactions. Leur étude cytologique met en évidence le rôle de premier plan joué par les cellules vivantes du xylème dont le métabolisme est rapidement perturbé. Des épaississements pariétaux sont édifiés dans les zones malades, des substances gommeuses viennent obstruer la lumière des vaisseaux mais ces formations dont les matériaux sont élaborés par les cellules du parenchyme xylémien (les cellules associées aux vaisseaux notamment), apparaissent de façon trop localisée et trop lente pour empêcher la progression du parasite.

Un accroissement considérable de l'activité peroxydasique des oeillets accompagne l'infection. Certains symptômes suggèrent une modification de l'équilibre hormonal de l'hôte.

Au cours de son développement, l'oeillet est confronté avec de nombreux microorganismes au niveau de son rhizoplan et aussi au sein de ses tissus. Pourtant peu d'entre eux sont capables de nuire à la plante. Pour tenter d'approcher les facteurs autorisant ou empêchant le déroulement du processus pathologique, des tiges d'oeillets ont été inoculées, les unes avec des spores du *P. cinerescens* (la plante est sensible à ce parasite dont la spécificité est pourtant étroite), les autres avec des spores du *Verticillium dahliae* (autre agent de trachéomycose dont les hôtes sont nombreux mais auquel l'oeillet est résistant).

La comparaison du comportement des deux champignons dans le xylème et des réactions de l'hôte à leur égard montre que la résistance de l'oeillet au *V. dahliae* n'est pas due à l'édification d'obstacles physiques empêchant sa progression mais, à des facteurs inhibant sa germination. Ces

facteurs paraissent se former par réaction de l'hôte à l'infection et acquérir très rapidement leur efficacité. Le *V. dahliae* présente, à leur égard, une sensibilité supérieure à celle du *F. cinerescens*.

Les recherches semblent devoir s'orienter vers la biochimie pour tenter de préciser les mécanismes mis en jeu, notamment dans la phase précoce de l'interaction qui peut être décisive.

SUMMARY

An acute tracheomycosis is induced in carnation by *Phialophora cinerescens* (Wr.) van Beyma. The symptoms of this disease have been described in experimental infections of the roots. Progress of the disease is dependent on several factors concerning the host, the parasite and their environment. Some of these factors were studied and their effect estimated. All conditions which favour a vigorous growth of the plant (age, improvement of nitrogenous nutrients, temperature and lighting conditions) or the penetration of the parasite (wounds of the roots, increase of the inoculum density in the soil) cause an acceleration of the pathological process.

Two different routes can be used by the parasite to invade the vessels of the host :

- active penetration : by growth of the mycelium through the cortical layers of rootlets which possess exudates inducing the germination of conidia present in the rhizosphere.

- passive penetration : by penetration of conidia in broken vessels at the levels of wounds of the underground part of the plant. These spores are carried in the xylem by the ascending stream of the sap up to the basal portion of the stem where the parasite can very quickly be detected (less than 48 hours).

Progression of *P. cinerescens* was followed at different stages of the disease , especially during the incubation period (lasting from seve-

ral weeks to several months even with the early penetration of conidia up to the stem). The pathological state became evident only after a long delay when the parasite already occupied a large part of the plant.

Localisation of the fungus when different symptoms were noticed, established that gummosis of the xylem and leafspots followed appearance of the parasite at a determined level. In contrast, the apical curvature was observed ahead of advance of the parasite mycelium.

Parasitic specificity of *P. cinerescens* was investigated. In addition of the g. *Dianthus* species, the fungus infected other Caryophyllaceae of the Silenoideae sub-family, mostly of the Diantheae tribe. In the absence of carnation, these susceptible plants may insure the maintenance of *F. cinerescens* in the soil. Nevertheless other species which did not present pathological symptoms may do the same since the parasite penetrates through the roots and may reach the basis of the stem.

Important reactions are provoked in carnation tissues by *P. cinerescens*. Cytological studies showed up the major role played by the xylem living cells whose metabolism is rapidly modified. In the diseased zones cell wall thickenings occured, gummous compounds blocked the lumen of the vessels, but their formation from materials produced by the xylem parenchyma cells (notably the vessel associated cells), was too localised and too slow to stop the progression of the parasite.

A striking increase in peroxydase activity was noticed in infected carnation. Certain symptoms suggested hormonal unbalance in the host.

During its growth, the carnation is in contact with numerous microorganisms at its rhizoplane and also in its tissues. Few of them are capable of harming the plant. In order to comprehend the factors which prevent or trigger pathological processes, stems of carnation were inoculated either with spores of *P. cinerescens* (the plant is susceptible to this quite specific parasite) or spores of *Verticillium dahliae* (a much less specific parasite which induces tracheomycosis in many hosts but to which carnation resists).

Comparison of the behavior of the two fungi in the xylem and of the reactions of the host showed that the carnation did not prevent the progression of *V. dahliae* by any physical barrier but produced factors which inhibited germination of the fungus. These factors appeared to be formed

through a reaction process against infection and to reach their full potency quickly. *V. dahliae* was more sensitive to these factors than *P. cinerescens*.

It seems that future research will have to be oriented towards biochemistry in order to obtain a more precise understanding of the mechanisms concerned, especially in the possibly decisive early phase.

ZUSAMMENFASSUNG

Phialophora cinerescens (Wr.) van Beyma verursacht bei der Nelke (*Dianthus caryophyllus* L.) eine ernste Trakeomykose, deren Äusserungen während experimentalen Infektionen in Wurzeln bestimmt wurden. Die Entwicklung dieser Krankheit steht unter dem Einfluss des Wirtes, des Parasiten und der Umweltfaktoren; die Rolle einiger dieser Einflüsse ist anerkannt. Alle die ein kräftiges Wachstum der Pflanze (Lebendsalter, Verbesserung der Nitrogenernährung, Wärme-und Lichtzustand) oder die Eindringung des Parasiten (Wurzelwunden, Anwuchs der Dichte des Inoculums im Boden begünstigen, verursachen eine Förderung des pathologischen Prozesses.

Der Parasit kann auf zwei verschiedene Wegen in die Wirtsgefässe gelangen :

- "aktiver" Eintritt : durch Myzeliumentwicklung durch die Rindgewebe der Würzelchen, dessen Exsudaten die Keimung der im Rhizosphär angelegten Konidien hervorufen;

- "passiver" Eintritt : durch Einführung der Konidien in die zerbrochenen Gefässe, der wunden Stellen des unterirdischen Teiles der Pflanze; diese Sporen sind durch den aufsteigenden Strom des Saftes im Xylem fortgeschwemmt worden; sie gelangen manchmal in den unteren Teil des Stengels, wo der Parasit nach einer sehr kurzen Zeit festgestellt werden kann (weniger als 48 Stunden).

Der Fortschritt des *P. cinerescens* wurde während der verschiedenen Phasen der Krankheit verfolgt, besonders während der Inkubationszeit, die immer viele Wochen oder viele Monate dauert, trotz des frühzeitigen Eintritts der Konidien bis in den Stengel). Der pathologische Zustand zeigt sich nur sehr spät, obwohl der Parasit schon einen grossen Teil der Pflanze bezetzt hat.

Wenn man den Pilz dann, wenn verschiedene Symptome erscheinen, lokalisiert, zeigt sich, dass die Xylemgummose und die Blattnekrosen in dem Moment auftreten, in dem der Pilz sich an einer bestimmten Stufe angesiedelt hat. Dagegen kann eine Krümmung des Stengels durch Fernwirkung des Pilzen verursacht werden.

Die parasitische Spezifizität des *P. cinerescens* wurde bestimmt: dieser Pilz infiziert die Pflanzen der Gattung *Dianthus* und auch andere Caryophyllaceae, die alle zu der Unterfamille Silenoideae, meistens zur Diantheae-abteilung gehören. Diese empfindlichen Pflanzen können, wenn keine Nelken vorhanden sind, *P. cinerescens* in der Erde zurückhalten; aber, andere Pflanzen, die keine pathologischen Symptome zeigen, können auch diese Rolle spielen : der Parasit infiziert ihre Wurzel und erreicht den Stengelfuss.

P. cinerescens verursacht wichtige Gegenwirkungen in den Nelkengeweben. Ihre zytologische Untersuchung zeigt die wichtige Rolle die die lebenden Xylemzellen spielen, deren Stoffwechsel schnell gestört wurde. Scheitelverdickungen werden in den kranken Teilen der Planze aufgebaut, gummiartige Stoffe im Lumen der Gefässe eingelagert, aber diese Reaktionen deren Stoffe von den Xylemparenchymzellen hergestellt werden (besonders die "Gefässverbunden Zellen") erscheinen zu lokalisiert oder zu langsam, um eine wirksame Abwehr des Parasiten zu bilden.

Einige Symptome lassen an eine Veränderung des hormonales Gleichgewichtes des Wirtes denken. Eine beträchtliche Vermehrung der peroxydasischen Tätigkeit der Nelken begleitet die Infektion.

Während ihrer Entwicklung befand sich die Wurzel und das Gewebe der Nelke in Gegenwart von mehreren Micro-organismen.

Doch nur einige sind fähig die Pflanze zu schaden.Um die Faktoren, die den pathologischen Prozess begünstigen oder schaden, besser zu kennen, wurden Nelkenstengel infiziert; einige mit Sporen von *P. cinerescens*

(die Pflanze ist empfindlich obwohl der Parasit eine Spezifizität zeigt) andere mit Sporen von *Verticillium dahliae* (ein anderer Trakeomykosenerreger, dessen Wirte zahlreich sind, aber denen die Nelke widersteht).

Wenn man das Verhalten der zwei Pilze gegenüber des Xylems und den Wirtsreaktionen vergleicht, zeigt sich, dass der Widerstand der Nelke gegen *V. dahliae* nicht durch physische Hindernisse verursacht wird, sondern durch Faktoren, die die Keimung verhindern. Diese Faktoren bilden sich scheinbar während der Reaktion des Wirtes gegen die Infektion, und sie erwerben sehr schnell ihre Wirksamkeit.*V. dahliae* ist, in dieser Hinsicht, empfindlicher als *P. cinerescens*.

Die weiteren Forschungen treten in den Bereich der Biochemie, die den Mechanismus bestimmen kann, vor allen Dingen die Frühphase der Wechselwirkung, die entscheidend sein kann.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AKAI S., 1959 - Histology of defense in plants. In HORSFALL J.G. and DIMOND A.E., Plant Pathology : an advanced treatise, vol. 1, 391-429, Academic Press, N.Y.

ALLEN P.J., 1966 - The role of the host in the development of disease symptoms. A review. Phytopathology, 56, 255-260.

ANDREUCCI E., 1963 - Osservazioni su alcuni gravi casi di fusariosi vascolare del Garofano in Toscana. Rivista dell'Ortoflorofrutticoltura Italiana, 47, 71-81.

ANDREUCCI E., 1963 - Indagini su un deperimento che colpisce le talee di Garofano durante la radicazione in piena terra. Rivista dell'Ortofloro-frutticoltura Italiana, 47, 548-561.

ANDREUCCI E., 1966 - I deperimenti del Garofano in Toscana. Atti del Primo Congresso dell'Unione Fitopatologica mediterranea, 223-231.

ARCHAMBAULT A., COURTOIS J.E., WICKSTROM A. et LE DIZET P., 1956- Soc. Chim. Biol., 38, 1121.

ARMSTRONG G.M. et ARMSTRONG J.K., 1948 - Nonsusceptible hosts as carriers of wilt Fusaria. Phytopathology, 38, 808-826.

BANFIELD W.M., 1941 - Distribution by the sap stream of spores of three fungi that induce vascular wilt diseases of elm. J. Agr. Res., 62, 637-681.

BECKMAN C.H., 1964 - Host responses to vascular infection. Ann. Rev. Phytopathol., 2, 231-252.

BECKMAN C.H., 1969 - Plasticizing of walls and gel induction in banana root vessels infected with Fusarium oxysporum Phytopathology, 59, 1477-1483.

BECKMAN C.H., 1969 - The mechanics of gel formation by swelling of simulated plant cell wall membranes and perforation plates of banana root vessels. Phytopathology, 59, 837-843.

BECKMAN C.H., 1971 - The plasticizing of plant cell walls and tylose formation ; a model. Physiol. Pl. Path., I, 1-10.

BECKMAN C.H. et HALMOS S., 1962 - Relation of vascular occluding reactions in banana roots to pathogenicity of root-invading fungi. Phytopathology, 52, 893-897.

BECKMAN C.H., HALMOS S. et MACE M.E., 1962 - The interaction of host, pathogen and soil temperature in relation to susceptibility to Fusarium wilt of bananas. Phytopathology, 52, 134-140.

BECKMAN C.H., MACE M.E., HALMOS S. et Mc GAHAN M.W., 1961 - Physical barriers associated with resistance in Fusarium wilt of bananas. Phytopathology, 51, 507-515.

BELL A.A. et PRESLEY J.T., 1969 - Temperature effects upon resistance and phytoalexin synthesis in cotton inoculated with Verticillium albo-atrum. Phytopathology, 59, 1141-1146.

BENNETT J. P., ANDERSEN F. G. et MILAD Y., 1927 - Methods of obtaining tracheal sap from woody plants. New Phytol., 26, 316-323.

BERTHET P., 1961 - Variation du nombre des noyaux dans les articles mycéliens des Discomycètes, en rapport avec la systématique et la physiologie. C. R. Acad. Sc., 252, 3855-3857.

BERTHET P., 1964 - Formes conidiennes de divers Discomycètes. Bull. Soc. Mycol. Fr., 80, 125-149.

BONIFACIO A., 1960 - Considerazioni sulla verticilliosi del Garofano. Riv. Ortoflorofrutticoltura Italiana, 44, fasc. 1-2, 9 p.

BONNEMAIN J. L., 1972 - La plante supérieure, siège d'une circulation complexe. Physiol. Vég., 10, 697-729.

BROWN F. H. et WILES A. B., 1970 - Reaction of certain cultivars and weeds to a pathogenic isolate of Verticillium albo-atrum from cotton. Plant Dis. Rept., 54, 508-512.

BRUNEL A., 1949 - Traité pratique de chimie végétale. Vol. 3, G. Frère, Tourcoing.

BUDDENHAGEN I. et KELMAN A., 1964 - Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by Pseudomonas solanacearum. Ann. Rev. Phytopathol., 2, 203-230.

BUGBEE W. M. et PRESLEY J. T., 1967 - A rapid inoculation technique to evaluate the resistance of cotton to Verticillium albo-atrum. Phytopathology, 57, 1264.

BUISMAN C., 1933 - Die Iepenziekte. Ned. Heidemaatsch, 45, 219-237.

BULIT J., LOUVET J. et BOUHOT D., 1967 - Recherches sur les fusarioses. I. Travaux sur le bayoud, fusariose du palmier dattier en Afrique du Nord. Ann. Epiphyties, 18, 213-239.

BURSTRÖM H. G., 1965 - The physiology of plant roots. In BAKER K. F. and SNYDER W. C., Ecology of soil-borne plant pathogens, 154-169.

BUSCH L. V. et EDGINGTON L. V., 1967 - Correlation of photoperiod with tuberisation and susceptibility of potato to Verticillium albo-atrum. Can. J. Bot., 45, 691-693.

BUSCH L. V. et SCHOOLEY H. D., 1970 - Environmental influence on symptom expression in Verticillium wilt of Chrysanthemum. Can. J. Bot., 48, 1939-1941.

CATESSON A. M., CZANINSKI Y., PERESSE M. et MOREAU M., 1972 a - Modifications des parois vasculaires de l'oeillet infecté par le Phialophora cinerescens (Wr.) van Beyma. C. R. Acad. Sc. Paris, 275, 827-829.

CATESSON A. M., CZANINSKI Y., PERESSE M. et MOREAU M., 1972 b - Altérations ultrastructurales des vaisseaux de l'oeillet atteint de verticilliose. J. Microscopie, 14, 26a-27a.

CHAMBERS H. L. et CORDEN M. E., 1963 - Semeiography of Fusarium wilt of tomato. Phytopathology, 53, 1006-1010.

CHAMPAGNAT P., 1969 - Croissance, morphogénèse et développement. Biologie végétale III, Masson et Cie, Paris.

CHAPPET A., 1972 - Contribution à l'étude des isoperoxydases du coléoptile de blé en relation avec la croissance. Thèse de IIIe cycle, Faculté des Sciences et des Techniques de Besançon, 90 p.

CHOLLET M. M. et MOREAU M., 1964 - Métabolisme glucidique du Phialophora cinerescens (Wr.) van Beyma ; synthèse de fructosanes et gommose des oeillets atteints de verticilliose. C. R. Acad. Sc. Paris, 257, 2160-2163.

CHOLLET M. M., MOREAU M. et MOREAU C., 1965 - Nutrition carbonée du Phialophora cinerescens (Wr.) van Beyma. Utilisation de divers oses et osides comme sources de carbone. Activités cellulolytique, amylolytique et gommolytique. Mycopathologia et Mycol. Appl., 25, 223-236.

CHOLLET M. M., MOREAU M. et PERESSE M., 1971 - Sur l'apparition d'une substance hétérosidique dans les tiges d'oeillets infectés par le Phialophora cinerescens (Wr.) van Beyma. C. R. Acad. Sc. Paris, 273, 2534-2537.

CLOWES F. A. L. et JUNIPER B. E., 1968 - Plant cells. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 546 p.

COIC Y., LESAINT C., PIOLLAT M. T. et LELANDAIS M., 1969 - Effet de la nutrition azotée nitrique sur l'évolution quantitative et qualitative des organes aériens du tabac. Ann. Physiol. Vég., 11, 5-26.

COLLINS R. P. et SCHEFFER R.P., 1968 - Respiratory responses and systemic effects in Fusarium-infected tomato plants. Phytopathology, 48, 349-355.

COOPER R. M. et WOOD R. K. S., 1973 - Induction of synthesis of extracellular cell-wall degrading enzymes in vascular wilt fungi. Nature, 246, 309-311.

CORDEN M. E. et DIMOND A. E., 1959 - The effect of growth regulating substances on disease resistance and plant growth. Phytopathology, 49, 68-72.

COURTOIS J. E. et ARIYOSHI U., 1960 - Bull. Soc. Chim. Biol., 42, 737.

COURTOIS J. E. et ARIYOSHI U., 1962 - Les galactosides du saccharose de quelques graines de Caryophyllacées. Bull. Soc. Chim. Biol., 44, 31-37.

COURTOIS J. E. et ARIYOSHI U., 1962 - Les galactosides du saccharose des racines d'oeillets. Bull. Soc. Chim Biol., 44, 23-29.

COURTOIS J. E. et PERCHERON F., 1965 - Les galactosides du saccharose chez les dicotylédones. Bull. Soc. Bot. Fr., Colloque de chimiotaxinomie. Mem : 1965, 29-40.

CRETE P., 1959 - Précis de Botanique. Tome II. Systématique des Angiospermes. Masson et Cie, éd., Paris.

CZANINSKI Y., 1968 - Etude du parenchyme ligneux du robinier (parenchyme à réserves et cellules associées aux vaisseaux) au cours du cycle annuel. J. Microscopie, 7, 145-164

CZANINSKI Y., 1972 - Observations ultrastructurales sur l'hydrolyse des des parois primaires des vaisseaux chez le Robinia pseudo-acacia L. et l'Acer pseudo-platanus L. C.R. Acad. Sc. Paris, 275, 361-363.

CZANINSKI Y., CATESSON A.M., MOREAU M. et PERESSE M., 1973 - Elaboration de matériel pariétal par des cellules associées aux vaisseaux en réponse à l'infection de l'oeillet par le Phialophora cinerescens (Wr.) van Beyma. C.R. Acad. Sc. Paris., 277, 405-407.

CZANINSKI Y., PERESSE M., CATESSON A.M. et MOREAU M., 1971 - Modifications ultrastructurales du xylème de l'oeillet infecté par le Phialophora cinerescens (Wr.) van Beyma. C.R. Acad. Sc. Paris, 273, 1576-1579.

CZANINSKI Y., POMERLEAU R. et MOREAU M. - Ultrastructure du xylème de l'orme atteint par le Ceratocystis ulmi (Buis.)C. Moreau. C.R. Acad. Sc. Paris (sous presse).

DAVIS D. et DIMOND A.E., 1953 - Inducing disease resistance with plant growth regulators. Phytopathology, 43, 137-140.

DAVIS D., WAGGONER P.E. et DIMOND A.E., 1953 - Conjugated phenols in the Fusarium wilt syndrome. Nature, 172, 950.

DEESE D.C. et STAHMANN M.A., 1962 - Pectic enzymes in Fusarium-infected susceptible and resistant tomato-plant. Phytopathology, 52, 255-260.

DIMOND A.E., 1962 - Wilt pathogens and oxygen levels in tracheal fluid of stems. Phytopathology, 52, 7.

DIMOND A.E., 1967 - Physiology of wilt disease. In MIROSHA et URITANI I., The dynamic role of molecular constituents in plant -parasite interaction, 100-120, Am. Phytopathol. Soc., 372 p.

DIMOND A.E., 1970 - Biophysics and biochemistry of the vascular wilt syndrome. Ann. Rev. Phytopathol., 8, 301-322.

DIMOND A.E. et HORSFALL J.G., 1960 - Inoculum and the diseased population. In HORSFALL J.G. and DIMOND A.E., Plant pathology : an advanced treatise, vol. 3, 1-22. Academic Press, N.Y.

DIXON G.R. et PEGG G.P., 1969 - Hyphal lysis and tylose formation in tomato cultivars infected by Verticillium albo-atrum. Trans. Brit. Mycol. Soc., 53, 109-118.

DUBOUCHET J., 1968 - Variations de l'état auxinique et régénération physiologique. Physiol. Vég., 6, 67-80.

DUBOUCHET J., MOREAU M., CHAPPET A. et MOROT-GAUDRY J.F., 1971 - Effets de l'extrait du Phialophora cinerescens (Wr.) van Beyma sur l'activité peroxydasique. C.R. Acad. Sc. Paris, 272, 3279-3282.

DUBOUCHET J., MOREAU M., MOROT-GAUDRY J.F. et PUGIN A., 1971 - Activité auxinolytique du Phialophora cinerescens (Wr.) van Beyma. C.R. Acad. Sc. Paris, 272, 1857-1860.

DUVAUCHELLE S., 1970 - Rapport de fin d'études. ENITA, Dijon.

EBBEN M.H., 1957 - Carnation wilts. Ann. Rep. Glasshouse Crops Res. Inst., 125-128.

EBBEN M. H., 1962 - The reduction of saprophytic contaminants in the carnation cultured-cutting test. J. Hort. Sci., 37, 16-23.

EDGINGTON L. V., CORDEN M. E. et DIMOND A. E., 1961 - The role of pectic substances in chemically induced resistance to Fusarium wilt of tomato. Phytopathology, 51, 179-182.

EL MAHJOUB M., 1971 - Quelques aspects des rapports entre les parasites vasculaires et leurs hôtes : fusariose du melon et verticilliose de l'oeillet. Thèse de 3e cycle. U. E. R. Sciences Biol., Brest, 108 p.

EMBERGER L., 1960 - Traité de botanique systématique. Tome II, Les végétaux vasculaires. Masson et Cie, éd., Paris.

ENGELHARD A. W., 1957 - Host index of Verticillium albo-atrum Reinke et Berth (including Verticillium dahliae Kleb.). Plant Dis. Rept., suppl. 244, 23-49.

EVANS G., 1971 - Influence of weed hosts on the ecology of Verticillium dahliae in newly cultivated areas of the Namoi Valley, New South Wales. Ann. Appl. Biol., 67, 169-175.

FARKAS G. L. et KIRALY Z., 1962 - Role of phenolic compounds in the physiology of plant diseases and disease resistance. Phytopath. Z., 44, 105-150.

FAVARGER C., 1946 - Recherches caryologiques sur la sous-famille des Silénoïdées. Bull. Soc. Bot. Suisse, 56, 364-465.

FELLOWS H., 1928 - Some chemical and morphological phenomena attending infection of the wheat plant by Ophiobolus graminis. J. Agr. Research, 37, 647-661.

FLETCHER J. T. et GANNEY G. W., 1966 - Verticillium wilt of carnations. N. A. A. S. Quaterly Review, n° 74, 65-73.

FOLIN O. et CIOCALTEU V., 1927 - On tyrosine and tryptophane determination in proteins. J. Biol. Chem., 73, 627-650.

FREDON J. J. et BONNEMAIN J. L., 1973 - Voies de transport et distribution des molécules organiques marquées après instillation de glucides ^{14}C dans le tubercule de Raphanus sativus L. Physiol. Vég., 11, 55-68.

GAGNON C., 1967 - Histochemical studies on the alteration of lignin and pectic substances in white elm infected by Ceratocystis ulmi. Can. J. Botany, 45, 1619-1623.

GARBER R. H. et HOUSTON B. R., 1966 - Penetration and development of Verticillium albo-atrum in the cotton plant. Phytopathology, 56, 1121-1126.

GARIBALDI A., 1966 - Osservazioni preliminari sulla resistenza di cultivars di Garofano all'avvizzimento da Phialophora cinerescens (Wr.) van Beyma. Atti 1° Congresso Unione Fitopatologica mediterranea, Bari-Napoli, 26 Settembre-1 Ottobre 1966, 571-573.

GARIBALDI A., 1967 - Influenza della composizione del substrato e di alcuni pratiche colturali sulla fialoforosi del Garofano. Atti Conv. naz. Floricolt. Trieste, Maggio 1967.

GARIBALDI A., 1968 - Sintomi esterni ed interni e risalita della Phialophora cinerescens (Wr.) van Beyma in piante di Garofano in relazione alla temperature ambiente. Phytopath. Medit., 7, 1-6.

GARIBALDI A., 1969 - Influenza di alcuni fattori sulla manifestazione dei sintomi e sulla diffusione della fialoforosi del Garofano. Phytopath. Medit., 8, 19-27.

GARRETT S.D., 1956 - Biology of root infecting fungi. Cambridge University Press, 293 p.

GARRETT S.D., 1960 - Inoculum potential. In HORSFALL J.G. and DIMOND A.E., Plant Pathology : and advanced treatise, vol. 3, 23-53, Academic Press, N.Y.

GENTILE I. et MATTA A., 1973 - Indoleacetic acid oxidase activity in relation to hyperauxiny in Fusarium wilt of tomato. Phytopath. Medit., 12, 43-47.

GOTHOSKAR S.S., SCHEFFER R.P., WALKER J.C. et STAHMANN M.A., 1965 - The role of enzymes in the development of Fusarium wilt of tomato. Phytopathology, 45, 381-387.

GRAHAM R.C. et KARNOVSKY M.J., 1966 - J. Histochem. Cytochem, 14, 291.

GRANITI A. et MATTA A., 1969 - Indirizzi attuali degli studi sulla patogenesi delle malattie vascolari. Ann. Phytopathol., 1, n°h.s., 77-120.

GREENIDGE K.N.H., 1952 - An approach to the study of vessel length in hardwood species. Ann. J. Bot., 34, 570-573.

GREGORY G.F., 1969 - A technique for inoculating plants with vascular pathogens. Phytopathology, 59, 1014.

GRIFFITHS D.A., 1971 - The development of lignitubers in roots after infection by Verticillium dahliae Kleb. Can. J. Microbiol., 17, 441-444.

GRIFFITHS D.A. et ISAAC I., 1966 - Host-parasite relationships between tomato and pathogenic isolates of Verticillium. Ann. Appl. Biol., 58, 259-272.

GRIFFITHS D.A. et LIM W.C., 1964 - Mechanical resistance in root hairs to penetration by species of vascular wilt fungi. Mycopath. Mycol. Appl., 24, 103-112.

GRISON R., 1972 - Recherches préliminaires sur les isoperoxydases des oeillets. Rapp. D.E.A., Faculté des Sciences et des Techniques de Besançon.

GRISON R., 1974 - Analyse de quelques aspects des variations de l'état isoperoxydasique endogène de l'oeillet sain ou expérimentalement infecté par le Phialophora cinerescens (Wr.) van Beyma, agent de la verticilliose. Thèse de 3e cycle, n° d'ordre 212, Faculté des Sciences et des Techniques de Besançon.

GRISON R., DUBOUCHET J., GALLOIS T. et PERESSE M., 1974 - Variations de l'activité peroxydasique globale chez des oeillets "Scania" expérimentalement infectés par le Phialophora cinerescens (Wr.)van Beyma. 99e congrès National des Sociétés Savantes, Besançon, 25-29 mars 1974 (sous presse).

GROSCLAUDE C., 1974 - La pénétration des spores de champignons dans les blessures de taille des arbres fruitiers. Application au cas de la protection biologique vis-à-vis du Stereum purpureum. Rev. Zool. Agr. et Pathol. Veg., 1, 1-21.

GRZELINSKA A., 1970 - Peroxydase isoenzymes in Fusarium-infected tomato plants. Phytopath. Z., 69, 212-222.

GUBA E. F., 1947 - Ann. Rep. of the Mass-Agric. Exp. St., 441, 72 p.

HALL R. and BUSCH L. U., 1971 - Verticillium wilt of Chrysanthemum : colonization of leaves in relation to symptom development. Can. J. Bot., 49, 181-185.

HELLMERS E., 1958 - Four wilt diseases of perpetual-flowering carnations in Denmark. Dansk Bot. Arkiv, 18, fasc. 2, 1-200.

HOEPFNER W., 1932 - Zwei neue reaktionen für kaffeesaüre und chlorogensaüre. Chemiker. Ztg., 56, 991.

HOLLEY W. D. et BAKER R., 1963 - Carnation production. W. C. Brown Co, Inc., Dubuque, Iowa, 142 p.

HUGUET J. G. et SAVE V., 1969 - Nouvelle méthode de prélèvement de la sève de Prunus domestica L., permettant de connaître l'évolution de sa composition pendant la durée de la floraison. C. R. Acad. Sc. Paris, 268, 668-671.

INGHAM J. L., 1973 - Disease resistance in higher plants. The concept of pre-infectional and post-infectional resistance. Phytopath. Z., 78, 314-335.

ISAAC I., 1949 - A comparative study of pathogenic isolates of Verticillium. Brit. Mycol. Soc. Trans., 32, 137-157.

ISAAC I., 1967 - Speciation in Verticillium. Ann. Rev. Phytopath., 5, 201-222.

JENKIS J. E. E., 1959 - Methods for the detection of vascular wilt pathogens in carnation cuttings. Plant Pathol., 8, 23-27.

JENSEN W. A., 1962 - Botanical histochemistry. Principles and pratice. W. H. Freeman and Co, San Francisco and London.

JOHANSEN D. A., 1940 - Plant microtechnique. Mc Graw-Hill Book Company, New-York and London, 521 p.

KATAN J., 1971 - Symptomless carriers of the tomato Fusarium wilt pathogens. Phytopathology, 61, 1213-1217.

KAWASHIMA N. et URITANI I., 1963 - Occurence of peroxidases in sweet potato infected by the black rot fungus. Agr. Biol. Chem., 27, 409-417.

KEEN N. T. et ERWIN D. C., 1971 - Endogalacturonase : evidence against involvement in Verticillium-wilt of cotton. Phytopathology, 61, 198-203.

KEYWORTH W.G. et HEWITT E J., 1948 - Verticillium wilt of the hop (Humulus lupulus). V : The influence of nutrition on the reaction of the hop plant to infection with Verticillium albo-atrum. J. Hort. Sci. 24, 219-227.

KOSUGE T , 1969 - The role of phenolics in host response to infection. Ann. Rev. Phytopathol., 7, 195-222.

KRAUSE C. R. et WILSON C. R., 1972 - Fine structure of Ceratocystis ulmi in elm wood. Phytopathology, 62, 1253-1256.

LACY M. L. et HORNER C. E , 1965 - Verticillium wilt of mint : interactions of inoculum density and host resistance. Phytopathology, 55, 1176-1178.

LACY M. K. et HORNER C. E , 1966 - Behavior of Verticillium dahliae in the rhizosphere and on roots of plants susceptible, resistant and immune to wilt. Phytopathology, 56, 427-430.

LANDIS W. R. et HART J. H., 1968 - Respiratory changes in Ceratocystis ulmi infected Ulmus americana. Phytopathology, 58, 1057.

LANGERON M., 1949 - Précis de microscopie. Masson et Cie éd., Paris.

LAST F. T. et EBBEN M. H., 1963(1964) - A preliminary study of factors affecting the spread of Verticillium cinerescens Wr. causing carnation wilt. Rep. Glasshouse Crops Res. Inst., 118-121.

LAYEC Y. et WOLFF C., 1971 - Sur quelques propriétés biophysiques de Phialophora cinerescens (Wr.) van Beyma et de son hôte. C. R. Soc. Biol., 165, 1767-1770.

LE GAL M. et MANGENOT F., 1956 - Contribution à l'étude des Mollisioïdées. I. Note préliminaire : les formes conidiennes. Rev. de Mycol., 21, 3-13.

LEMATTRE M., 1968 - Parasites vasculaires de l'oeillet américain : leur détection par microscopie de fluorescence. C. R. Acad. Agr. Fr., 54, 440-447.

LEMATTRE M. et GROUET D , 1970 - Application de la microscopie de fluorescence pour détecter la présence d'un Verticillium sp. sur Pelargonium. Ann. Phytopathol., 2, 525-533.

LE PICARD D., 1972 - Contribution à l'étude de l'effet température sur le Phialophora cinerescens (Wr.) v. Beyma. Rapp. D. E. A., Fac. Sci. Rennes, oct. 1972, 23 p.

LEWIS E. R., 1959 - Some aspects of the morphology, physiology and pathology of Phialophora cinerescens syn. Verticillium cinerescens. M. Sc. Thesis, Univ. Wales.

LILLY V. G., 1965 - The chemical environment for fungal growth : media, macro ant micronutrients. In AINSWORTH G. C. and SUSSMAN A. S., The fungi : an advanced treatise, vol. 1, 465-478, Academic Press, N. Y.

LISON L., 1960 - Histochimie et Cytochimie animales. Principes et méthodes, 2 vol. Gauthier-Villars Ed., Paris.

LOISEAU J. E., 1965 - Anisocladie hélicoïdale et hélices foliaires multiples chez quelques Angiospermes. In Travaux dédiés à Plantefol, Masson et Cie éd., p. 366-389.

MACE M. E., 1965 - Isolation and identification of 3-indoleacetic acid from Fusarium oxysporum f. cubense. Phytopathology, 55, 240-241.

McKEEN C. D. et THORPE H. J., 1973 - Pathogenic species of Verticillium in horticultural crops and weeds in South Western Ontario. Can. J. Plant Sci., 53, 615-622.

MALAMUD O. S. et O'KEEFE R. B., 1971 - Inheritance of the reaction of potatoes to Verticillium wilt and methods of screening segregating populations. Abstr. International Verticillium Symposium, Wye College, p. 24.

MAMELI CALVINO E., 1938 - Rassegna dei casi fitopatologici osservati nel 1937. La Costa Azzura, 18, 11-17.

MARAITE H., 1970 - Qualitative and quantitative changes induced in the polyphenoloxidases of plants by several ecological factors. NATO Advanced Study Institute, Pugnichiuso. In WOOD R. K. S., BALLIO A. and GRANITI A.: Phytotoxins in plant diseases, Academid Press, 1972.

MARTINSON C. A. et HORNER C. E., 1962 - Importance of nonhosts in maintaining the inoculum potential of Verticillium. Phytopathology, 52, 742.

MATTA A., 1962 - Endoterapia della fusariosi del pomodoro con sostanze ad azione regolatrice di crescita. Riv. Patol. Veg., ser. III, 2, 234-244.

MATTA A., 1965 - Variations of the auxin level in vascular diseases of plants. Mechanisms of I. A. A. accumulation. Atti. Semin. Studi Biol., 2, 5-10.

MATTA A. et DIMOND A. E., 1963 - Symptoms of Fusarium wilt in relation to quantity of fungus and enzyme activity in tomato stems. Phytopathology, 53, 574-578.

MATTA A. et GENTILE I., 1964 - Variazioni del contenuto in auxine indotte nel pomodoro da Fusarium oxysporum f. lycopersici. Riv. Patol. Veg., ser. 3, 208-237.

MATTA A. et GENTILE I., 1965 - Sul meccanismo di accumulo dell'acido B-indolilacetico in piante di pomodoro infette da Fusarium oxysporum f. lycopersici. Phytopath. Medit., 4, 129-137.

MATTA A. et GENTILE I., 1968 - The relation between polyphenoloxidase activity and ability to produce indoleacetic acid in Fusarium-infected tomato plants. Neth. J. Pl. Path., 74 (1968 suppl.), 47-51.

MATTA A., GENTILE I. et GIAI I., 1969 - Accumulation of phenols in tomato plants infected by different forms of Fusarium oxysporum. Phytopathology, 56, 512-513.

MATTA A., GENTILE I. et GIAI I., 1970 - Effect of mixed inoculation with Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici and F. oxysporum f. sp. dianthi on the phenol content of tomato plants. Neth. J. Plant Pathol., 76, 144-146.

MATTA A. et KERLING L. C. P., 1964 - Verticillium albo-atrum as a parasite of Senecio vulgaris. Neth. J. Plant pathol., 70, 27-32.

METCALFE C. R. et CHALK L., 1957 - Anatomy of the Dicotyledons. vol. I, 724 p. Clarendon Press, Oxford.

MOREAU C., 1963 - Morphologie comparée de quelques Phialophora et variations du P. cinerescens (Wr.) van Beyma. Rev. de Mycol., 28, 260-276.

MOREAU M., 1957 -Recherches sur les maladies de dépérissement causées par les champignons. Etude particulière du dépérissement des oeillets. Encycl. Mycol., 309 p., Lechevalier, Paris.

MOREAU M., 1957 - Tissu ligneux du collet et susceptibilité de l'oeillet cultivé aux parasites vasculaires. Bull. Soc. Bot. Fr., 104, 257-259.

MOREAU M., 1957 - Evolution du complexe lignifiant de l'oeillet cultivé sous les attaques du Phialophora cinerescens. Rev. de Mycol., 22, 155-165.

MOREAU M., 1958 - La verticilliose de l'oeillet. Rev. Horticole, 130, 1831-1834.

MOREAU M., 1962 - Influence de la température sur le développement du Phialophora cinerescens (Wr.) van Beyma, agent de la verticilliose de l'oeillet des fleuristes. C.R. Acad. Sci. Paris, 255, 162-164.

MOREAU M., 1963 - Un hôte indésirable qui apprécie le froid sur la côte d'Azur, le Phialophora cinerescens. Science et Nature, 56, 19-23.

MOREAU M., 1963 - Réponses de l'oeillet aux attaques du Fusarium roseum (Lk) Sn. et H. et du Phialophora cinerescens (Wr.) van Beyma. Atti Convegno internaz. Sul Garofano, San Remo, 3 mars 1962, 56-75.

MOREAU M., 1963 - Recherche systématique du Phialophora cinerescens (Wr.) v. Beyma dans les tissus de Caryophyllacées expérimentalement infectées. C.R. Acad. Agric. Fr., 11, 862-865.

MOREAU M., 1964 - Fongicides endothérapiques à activité morphogène pour induire, chez les plantes, une résistance aux maladies vasculaires. Phytopathol. Z., 50, 143-158.

MOREAU M., 1970 - La verticilliose de l'oeillet. Un modèle intéressant pour aborder les rapports hôte-parasite dans les maladies vasculaires. Hort. Fr., 1, 19-28.

MOREAU M. et AUZOLLE F., 1964 - Conditions thermiques favorables à la croissance linéaire et à la germination du Phialophora cinerescens (Wr.) van Beyma. Ann. Sci. Nat., Bot., 12e ser., 5, 773-782.

MOREAU M. et CHOLLET M., 1963 - Quelques facteurs modifiant la croissance pondérale et la sporulation du Phialophora cinerescens (Wr.) van Beyma. Bull. Soc. Mycol. Fr., 79, 382-391.

MOREAU M., CHOLLET M.M. et PERESSE M., 1971 - Etude comparée des glucides solubles et membranaires chez des oeillets sains ou expérimentalement infectés par le Phialophora cinerescens (Wr.) van Beyma. Mycopathol. Mycol. Appl., 43, 289-296.

MOREAU M., CZANINSKI Y., CATESSON A.M., PERESSE M., 1973 - Les cellules associées aux vaisseaux, siège des réactions de défense contre l'agression parasitaire dans les tissus du xylème de l'oeillet. C.R. Acad. Sc. Paris, 277, 1017-1020.

MOREAU M. et LE PICARD D., 1971 - Influence de la température sur la sporulation du Phialophora cinerescens (Wr.) van Beyma. Bull. Soc. Mycol. Fr. 87, 45-53.

MOREAU M. et PERESSE M., 1969 - Influence de quelques facteurs sur l'expression des symptômes dans la verticilliose de l'oeillet. Phytopathol. Z., 66, 280-290.

MOREAU M. et PERESSE M., 1972 - Aptidude comparée de quelques champignons non pathogènes et du Phialophora cinerescens à atteindre directement les vaisseaux caulinaires de l'oeillet. Rev. Mycol., 36, 175-184.

MOREAU M., PERESSE M. et EL MAHJOUB M., 1971 - Pouvoir pathogène de de différents isolats de Phialophora cinerescens (Wr.) van Beyma vis-à-vis de l'oeillet. C. R. Soc. Biol., 165, 2415-2418.

MOREAU M., PERESSE M. et MOREAU C., 1969 - Observations récentes sur la verticilliose de l'oeillet. Ann. Phytopathol., 1, n° h. s., 237-242. (2e congr. Union Phytopathol. Médit., Avignon-Antibes).

MUSSEL H. W., 1973 - Endopolygalacturonase : evidence for involvement in Verticillium wilt of cotton. Phytopathology, 63, 62-70.

NELSON P. E. et DICKEY R. S., 1963 - Reaction of twenty-one commercial carnation varieties to Pseudomonas caryophylli. Phytopathology, 53, 320-324.

NILSSON G. I., 1964 - Phialophora wilt of carnation, Dianthus caryophyllus L. The behavior of the pathogen, Phialophora cinerescens (Wr.) van Beyma, in the host and in the soil. M. Sc. Thesis. Cornell Univ. Ithaca, N. Y., 101 p.

NILSSON G. I. et NELSON P. V., 1964 - Nitrogen nutrition and development of Phialophora cinerescens in carnation. Phytopathology, 54, 1172-1173.

NOUGAREDE , 1969 - Biologie végétale : I. Cytologie, 598 p. Masson et Cie, éd.

NOZERAN R. et BANCILHON L., 1974 - Multiplication végétative chez les végétaux vasculaires. Coll. de morphogenèse, Soc. Bot. Fr., 7-8 mars 1974, Orsay, 32 p. ronéot.

O'BRIEN T. P., 1970 - Further observations on hydrolysis of the cell wall in the xylem. Protoplasma, 69, 1-14.

O'BRIEN T. P. et THIMANN K. V., 1967 - Observations on the fine structure of the oat coleoptile. III. Correlated light and electron microscopy of the vascular tissues. Protoplasma, 63, 443-478.

OSHIMA N., LIVINGSTON C. H. et HARRISON M. D., 1963 - Weeds as carriers of two potato pathogens in Colorado. Plant Dis. Reptr., 47, 466-469.

PAYEN J., 1962 - Recherches sur le comportement des champignons dans les sols. I : expériences préliminaires. Bull. Ecole Nat. Sup. Agro. Nancy, 4, fasc. 1, 52-70.

PAYEN J., 1964 - Recherches sur le comportement des champignons dans les sols. II. Réalisation de modèles pour l'analyse quantitative des interactions. Ann. Inst. Pasteur, 107, 231-241.

PEGG G. F. et SELMAN I. W., 1959 - An analysis of the growth response of young tomato plants to infection by Verticillium albo-atrum. II. The production of growth substances. Ann. Appl. Biol., 47, 222-231.

PENNYPACKER B. W. et NELSON P. E., 1972 - Histopathology of carnation infected with Fusarium oxysporum f. sp. dianthi. Phytopathology, 62, 1318-1326.

PEREAU-LEROY P., 1965 - Amélioration des plantes et rayonnements ionisants. Bull. Inf. Scient. Techn. C. E. A., n° 93, 1-8.

PERESSE M., 1968 - Localisation du Phialophora cinerescens (Wr.) van Beyma dans la tige de l'oeillet au cours de l'incubation. C. R. Acad. Sc. Paris, 267, 1514-1516.

PERESSE M., 1968 - Réactions de défense du concombre (Cucumis sativus L.) aux attaques du Verticillium dahliae Kleb. Soc. Bot. Fr., Mem. 1968, 115, 70-74.

PERESSE M., 1971 - Pénétration directe et transport passif de spores de Phialophora cinerescens (Wr.) van Beyma dans le xylème de l'oeillet. Phytopath. Medit., 10, 260-268.

PERESSE M., 1973 - Influence de la densité de l'inoculum sur l'évolution de la verticilliose de l'oeillet. Ann. Phytopathol., 5, 309-314.

PERESSE M., 1973 - Inoculation de tiges d'oeillets avec des spores de Phialophora cinerescens ou de Verticillium dahliae : étude comparée du comportement des deux champignons et de quelques réactions du xylème de la plante. Ann. Phytopathol., 5, 108.

PERESSE M., 1974 - Modifications cytologiques dans le xylème de tiges d'oeillets expérimentalement infectées, au cours de l'installation du Phialophora cinerescens (Wr.) van Beyma. Phytopath. Z., 79, 35-46.

PERESSE M. et MOREAU M., 1968 - Essai d'expression numérique des symptômes de la verticilliose sur oeillets. C. R. Soc. Biol., 162, 234-237.

PERESSE M. et MOREAU M., 1969 - Susceptibilité de diverses Caryophyllacées à la verticilliose. C. R. Acad. Agric. Fr., 12, 1277-1280.

PERESSE M., MOREAU M. et EL MAHJOUB M., 1971 - Aptitude parasitaire du Verticillium dahliae Kleb. vis-à-vis de l'oeillet. C. R. Soc. Biol., 165, 1783-1786.

PESANTE A., 1958 - La fialoforosi del Garofano nella Riviera dei Fiori (Liguria occidentale). Bol. Lab. Sper. Osserv. Fitopatol., 21, N. S., fas. 2, 85-109.

PILET P. E., 1961 - Les phytohormones de croissance. Masson et Cie, éd., Paris, 774 p.

PILET P. E. et GASPAR T., 1968 - Le catabolisme auxinique. Monographie de physiologie végétale, Masson et Cie, éd.

POMERLEAU R., 1965 - The period of susceptibility of Ulmus americana to Ceratocystis ulmi under conditions prevailing in Quebec. Can. J. Bot., 43, 787-792.

POMERLEAU R., 1966 - Relations of early cambial activity in white elm and infection by Ceratocystis ulmi (Buis.) C. Moreau. Can. J. Bot., 44, 109-111.

POMERLEAU R., 1970 - Pathological anatomy of theDutch elm disease. Distribution and development of Ceratocystis ulmi in elm tissues. Can. J. Bot., 48, 2043-2057.

POMERLEAU R. et MEHRAN A.R., 1966 - Distribution of spores of Ceratocystis ulmi labelled with phosphorus 32 in green shoots and leaves of Ulmus americana. Naturaliste can., 93, 577-582.

POWELSON R. L., 1970 - Significance of population level of Verticillium in soil. In TOUSSOUN T. A., BEGA R. U. and NELSON P. E., Root diseases and soil-borne pathogens, 31-33.

PRESLEY J. T., CARNS H. R., TAYLOR E. E. et SCHNATHORST W. C., 1966. Movement of conidia of Verticillium albo-atrum in cotton plant. Phytopathology, 56, 375.

PRESLEY J. T. and TAYLOR E. E., 1969 - Ontogeny of vessels influence the development of Verticillium in young cotton plant. Phytopathology, 59, 253-254.

PUGIN A., 1973 - Etude préliminaire de quelques propriétés biologiques du compartiment extracellulaire (brut ou partiellement purifié) du Phialophora cinerescens (Wr.) van Beyma, agent de la verticilliose des oeillets. Thèse de 3e cycle, n° d'ordre 179, Faculté des Sciences et des Techniques de Besançon.

PUGIN A., DUBOUCHET J., GRISON R. et MOREAU M., 1974 - Effet de l'extrait de différents filtrats de culture du Phialophora cinerescens (Wr.) van Beyma sur l'activité peroxydasique de la racine du Lens. C. R. Acad. Sc. Paris, 278, 739-742.

PUGIN A., DUBOUCHET J., GUIGNARD E., 1974 - Effets de quelques métabolites élaborés par le Phialophora cinerescens (Wr.) van Beyma sur la croissance de la racine de lentille. 99e Congrès National des Sociétés Savantes, Besançon, 25-29 mars 1974 (sous presse).

PUGIN A., DUBOUCHET J., ROUSSET M. et MOREAU M., 1974 - Purification partielle d'extraits de filtrats de culture de Phialophora cinerescens (Wr.) van Beyma cultivé dans différentes conditions. C. R. Acad. Sc. Paris, 278, 877-880.

RANNEY C. D., 1962 - Effects of nitrogen source and rate on the development of Verticillium wilt of cotton. Phytopathology, 52, 38-41.

REEVE R. M., 1950 - Histochemical tests for polyphenols in plant tissues. Stain Technology, 26, 91-96.

REID J., 1958 - Studies on the Fusaria which cause wilt in melons. I. The occurence and distribution of races of the muskmelon and watermelon Fusaria and a histological study of the colonisation of muskmelon plants susceptible or resistant to Fusarium-wilt. Can. J. Bot., 36, 394-410.

RENARD J. L., 1970 - La fusariose du palmier à huile. Rôle des blessures de racines dans le processus d'infection. Oléagineux, 25e année, n°11, 581-586.

ROBERTS F. M., 1944 - Factors influencing infection of the tomato by Verticillium albo-atrum. Ann. Appl. Biol., 31, 191-193.

ROBINSON J. A., 1961 - Wilt and dieback of the carnation in New-Zealand. N. Z. J. Agric. Res., 4, 660.

ROODENBURG J. W. M., 1945 - Vaat-en voetziekten in Amerikaanse Anjers. Tijdschr. Pl. Ziekten, 51, 16-24.

RUBIN B. A. et ARTSIKHOVSKAYA E. V., 1964 - Biochemistry and pathological darkening of plant tissues. Ann. Rev. Phytopathol., 2, 157-178.

SAALTINK G. J., 1955 - Het binnendringen van Fusarium oxysporum en resistente lupine planten. Tijdschr. Plantenziekten, 61, 23.

SAALTINK G. J. et DIMOND A. E., 1964 - Nature of plugging material in xylem and its relation to rate of water flow in Fusarium infected tomato stems. Phytopathology, 54, 1137-1140.

SACHS I. B., NAIR V. M. G. et KUNTZ J. E., 1967 - Penetration and degradation of cell walls in oak sapwood by Ceratotystis fagacearum. Phytopathology, 57, 827-828.

SAGAWA Y. et MEHLQUIST G. A. L., 1956 - Radiation, a new tool in carnation breeding. Carnation craft, n° 37.

SAGAWA Y. et MEHLQUIST G. A. L., 1957 - Mechanism responsible for some X-rays induced changes in flower color of carnations. Am. J. Bot., 44, 397-403.

SCHEFFER R. P. et WALKER J. C., 1953 - The physiology of Fusarium-wilt of tomato. Phytopathology, 43, 116-125.

SCHNATHORST W. C., 1971 - Nomenclature and physiology of Verticillium species, with emphasis on the V. albo-atrum versus V. dahliae controversy. In Verticillium wilt of cotton, Proc. of a work conference, Nat. Cotton Pathol. Res. Lab., College Station, Texas, 1-19.

SCHOLANDER P. F., LOVE W. E. et KANWISHER J. W., 1955 - The rise of sap in tall grapevines. Plant Physiol., 30, 93-104.

SCHOLANDER P. F., RUUD B. et LEIVESTAD H., 1957 - The rise of sap in a tropical liana. Plant Physiol., 32, 1-6.

SCHOL SCHWARTZ M. R., 1970 - Revision of the genus Phialophora. Persoonia, 6, 59-94.

SCHROTH M. N. et HILDEBRAND D. C., 1964 - Influence of plant exsudates on root-infecting fungi. Ann. Rev. Phytopathol., 2, 101-132.

SEQUEIRA L., 1963 - Growth regulators in plant disease. Ann. Rev. Phytopathol., 1, 5-30.

SEQUEIRA L. et KELMAN A., 1962 - The accumulation of growth substances in plant infected by Pseudomonas solanacearum. Phytopathology, 52, 439-448.

SEWEL G. F. et WILSON J. F., 1964 - Occurence and dispersal of Verticillium conidia in xylem sap of the hop. Nature, Lond., 204, 901.

STURM A. et SCHEJA H. W., 1964 - J. Chromatogr., 16, 194.

SWAIN T., 1963 - Chemical plant taxonomy. Academic Press, London and New-York.

TALBOYS P. W., 1958 - Some mechanisms contributing to Verticillium- resistance in the hop root. Trans. Brit. Mycol. Soc., 41, 227-241.

TALBOYS P. W., 1958 - Association of tyloses and hyperplasia of the xylem with vascular invasion of the hop by Verticillium albo-atrum. Trans. Brit. Mycol. Soc., 45, 280-281.

TALBOYS P. W., 1972 - Resistance to vascular wilt fungi. Proc. Roy. Soc. Lond. B, 181, 319-332.

THIERY J. P., 1967 - Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. J. Microscopie, 6, 987-1018.

THIMANN K. W., 1963 - Plant growth substances : past, present and future. Ann. Rev. Plant Physiol., 14, 1-18.

THIMANN K. V. et GROCHOWSKA M. J., 1968 - A role of trypthophan and tryptamine as IAA precursors. In WIGHTMAN F. and SETTERFIELD G., Biochemistry and Physiology of plant growth substances, 231-242, The Runge Press, Ottawa.

THOMPSON H. C., 1961 - Studies on the occurence and distribution of the oak wilt fungus in oak leaves. Plant. Dis. Rep., 45, 839-840.

TIRILLY Y., 1970 - Contribution à l'étude du Phialophora cinerescens (Wr.) van Beyma : observations des noyaux et de quelques variations morphologiques ; germination de spores isolées. Rapp. D. E. A. Fac. Sci. Rennes, Oct. 1970, 14 p.

TIRILLY Y. et LE PICARD D., 1973 (1974) - Variations du contenu nucléaire dans le mycélium et les spores du Phialophora cinerescens (Wr.)van Beyma. Rev. de Mycol., 38, 45-50.

TOLMSOFF W. J., 1959 - The influence of quantity of inoculum on the severity of Verticillium wilt. M. Sc. Thesis, Oregon State University.

TOMIYANA K. et STAHMANN M. A., 1964 - Alteration of oxidative enzymes in potato tuber tissues by infection with Phytophthora infestans. Plant Physiol. 39, 483-490.

VAN ANDEL O. M. et FUCHS A., 1970 - Interference with plant growth regulation by microbial metabolites. In WOOD R. K. S., BALLIO A. et GRANITI A., Phytotoxins in plant diseases, NATO Advanced Study Institute, Pugnochiuso, Academic Press, 1972.

VAN BEYMA THOE KINGMA F. H., 1943 - Beschreibung der im Centraalbureau voor Schimmelcultures vorhandenen Arten der Gattungen Phialophora Thaxter und Margarinomyces Laxa, nebst Schlüssel zu ihrer Bestimmung. Antonie van Leeuwenhoek, 9, 51-76.

VAN DER MEER J.H.H., 1925 - Verticillium wilt of herbaceous and woody plants. Meded. Landbhogesch., Wageningen, 28, 1-82.

VIGOUROUX A., 1972 - Rôle des mauvaises herbes dans la conservation du Verticillium dans les cultures. 3e Congrès de l'Union Phytopathol. Medit. 22-28/10/72, Oeiras, Portugal.

VIGOUROUX A., CASTELAIN C. et CONUS M., 1969 - La guérison de la verticilliose chez l'abricotier. Ann. Phytopath. I, n° h. s., 230-236. 2e Congrès de l'Union Phytopath. Médit.

VINOT M. et BOUSCARY A., 1952 - Etude pour l'amélioration de l'oeillet pour la fleur coupée. Résultats obtenus en culture d'oeillets sur sable. Rev. Hort., 124, fasc. 2188, 703-708 ; fasc. 2189, 742-745.

VOLKEN P., 1972 - Quelques aspects des relations hôte-parasite en fonction de traitements à l'acide indole-acétique et à l'acide gibberellique. Phytopath. Z., 75, 163-174.

VORSATZ F., 1942 - Über eine kolorimetrische methode der Gerbstoffbestimmung. Collegium, 872, 424-427.

WAGGONER P.E. et DIMOND A.E., 1954 - Reduction in water flow by mycelium in vessels. Ann. J. Bot., 41, 637-640.

WAGGONER P.E. et DIMOND A.E. 1955 - Production and role of extracellular pectic enzymes of Fusarium oxysporum f. lycopersici. Phytopathology, 45, 79-87.

WAITE B.H. et DUNLAP V.C., 1953 - Preliminary host range studies with Fusarium oxysporum f. cubense. Plant Dis. Reptr., 37, 79-80.

WARD C.W., 1903 - The american carnation. A.T. De La Mare Co, Ltd., N.Y., 296 p.

WATSON A.G. et FORD E.J., 1972 - Soil fungistasis : a reappraisal. Ann. Rev. Phytopath., 10, 327-348.

WHITE H.L., 1936 - Verticillium wilt of the perpetual-flowering carnation. Ann. Rep. Exp. Sta., Cheshunt, 48-52.

WICKENS G.M., 1935 - Wilt, stem rot and dieback of the perpetual flowering carnation. Ann. Appl. Biol., 22, 630-683.

WIESE M.V., DEVAY J.E. et RAVENSCROFT A.V., 1970 - Relationship between polygalacturonase activity and cultural characteristics of Verticillium isolates pathogenic in cotton. Phytopathology, 60, 641-646.

WIGHTMAN F. et COHEN D., 1968 - Intermediary steps in the enzymatic conversion of tryptophan to IAA in cell-free systems from mung bean seedlings. In WIGHTMAN F. et SETTERFIELD G., Biochemistry and Physiology of plant growth substances, 273-288, The Runge Press, Ottawa.

WILHELM S., 1955 - Verticillium wilt of the strawberry with special reference to resistance. Phytopathology, 45, 387-391.

WILHELM S. et THOMAS H.E., 1952 - Solanum sarachoides, an important weed host to Verticillium albo-atrum. Phytopathology, 42, 519-520.

WILLIAMS P.H., OYLER E., WHITE H.L., AINSWORTH G.C. et SELMAN L.W., 1940 - Plant diseases. Rep. Exp. Res. Stn. Cheshunt, 1939, 28-38.

WOLF R.T. et NELSON P.E., 1969 - An anatomical study of carnation stems infected with the carnation strain of Erwinia chrysanthemi. Phytopathology, 59, 1802-1808.

WOLLENWEBER H.W., 1930 - Die Wirtelpilz-Welkekrankheit (verticilliose) von Ulme, Ahorn und Linde usw. Arb. a. d. Biol. Reichsanst., 17, 272-299.

WOOD R.K.S., 1967 - Physiological plant pathology. Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh, 570 p.

WRIGHT D.S.C., 1969 - Verticillium wilt of tobacco. IX : The relationship between leaf symptoms and levels of infection in the organs of mature tobacco plants. N.Z.J. Agric. Res., 12, 228-239.

Vu
Le Président du Jury :

Mme M. MOREAU

Vu
Le Directeur
de l'UER Sciences
Exactes et Naturelles :

M. P. SAUMAGNE

Vu et permis d'imprimer
BREST, le 24 Janvier 1975
Le Président de l'Université
de Bretagne Occidentale :

M.J. QUERRE